

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مجله علمی و پژوهشی
فلسفه و معرفت

علمی-پژوهشی

سال پنجم - شماره چهاردهم - بهار ۱۳۹۲

مجلهٔ تاکسونومی و بیوسیستماتیک بر اساس ابلاغیه شماره ۳/۱۱/۹۵۵ مورخ
۱۳۸۸/۰۶/۳۱ کمیسیون بررسی نشریات علمی وزارت علوم تحقیقات و فناوری،
دارای درجه علمی-پژوهشی و شماره استاندارد بین‌المللی (شاپا) ۸۹۰۶-۲۰۰۸
(نسخه چاپی) و شماره استاندارد بین‌المللی ۲۱۹۰-۲۳۲۲ (نسخه الکترونیک)
از سازمان اسناد و کتابخانه ملی جمهوری اسلامی ایران می‌باشد.

متن کامل مجله در پایگاه‌های اطلاع‌رسانی زیر نمایه می‌شود:

<http://uijs.ui.ac.ir/tbj>

پایگاه اختصاصی مجله

<http://www.magiran.com>

بانک اطلاعات نشریات کشور

<http://www.SID.ir>

پایگاه اینترنتی جهاد دانشگاهی

<http://www.ISC.gov.ir>

پایگاه استنادی علوم جهان اسلام

اطلاعات مجله در پایگاه زیر فهرست شده است:

<http://ulrichsweb.serialssolutions.com>

اولریخ: راهنمای بین‌المللی نشریات ادواری

چاپ و لیتوگرافی: انتشارات دانشگاه اصفهان

ناشر: دانشگاه اصفهان

انتشار: بهار ۱۳۹۲

تاکسونومی و بیوسیستماتیک
سال پنجم - شماره چهاردهم - بهار ۱۳۹۲
شماره استاندارد بین‌المللی: ۸۹۰۶-۲۰۰۸
شماره استاندارد بین‌المللی (الکترونیک): ۲۱۹۰-۲۳۲۲
علمی-پژوهشی

صاحب امتیاز: معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان

سر دبیر: دکتر محمدرضا رحیمی نژاد رنجبر
دانشگاه اصفهان

اعضای هیأت تحریریه

دکتر حمید اجتهادی	استاد - دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر علی اکبر احسانپور	استاد - دانشگاه اصفهان
دکتر جمشید درویش	استاد - دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر هما رجایی	دانشیار - دانشگاه شیراز
دکتر محمدرضا رحیمی نژاد رنجبر	استاد - دانشگاه اصفهان
دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی	استاد - دانشگاه صنعتی اصفهان
دکتر مهرداد عباسی	دانشیار - مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور
دکتر حسین فتح‌پور	دانشیار - دانشگاه اصفهان
دکتر علی اصغر معصومی	استاد - مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور
دکتر ایرج نحوی	استاد - دانشگاه اصفهان
دکتر صادق ولیان بروجنی	دانشیار - دانشگاه اصفهان

مدیر اجرایی: فریبا هادیان (کارشناس ارشد)

ویراستار انگلیسی علمی-تخصصی: فریدون پرویزیان

ویراستار تخصصی: فریبا هادیان

صفحه‌آرای تخصصی: فریبا هادیان

ناشر: انتشارات دانشگاه اصفهان

نشانی: اصفهان - خیابان هزار جریب - دانشگاه اصفهان - ساختمان کتابخانه مرکزی - معاونت پژوهش و فناوری

طبقه دوم - اداره چاپ، انتشارات و مجلات - کد پستی: ۸۱۷۴۶۷۳۴۴۱ - دفتر مجله تاکسونومی و بیوسیستماتیک

نشانی پست الکترونیک: TBJ@ui.ac.ir

پایگاه اختصاصی مجله: <http://uijs.ui.ac.ir/tbj>

شماره تماس: ۰۹۸-۳۱۱-۷۹۳۴۲۵۵

شماره دورنگار: ۰۹۸-۳۱۱-۷۹۳۲۱۷۷

معرفی مجله تاکسونومی و بیوسیستماتیک

مجله تاکسونومی و بیوسیستماتیک به صورت فصلنامه و هر سه ماه یکبار توسط دانشگاه اصفهان منتشر می‌شود. هدف از انتشار این مجله معرفی یافته‌های علمی استادان و پژوهشگران در زمینه تاکسونومی و بیوسیستماتیک، به ویژه با تأکید بر خزانه وراثتی جانداران (یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها) در ایران می‌باشد. مجله علمی - پژوهشی تاکسونومی و بیوسیستماتیک در زمینه‌های معرفی تاکسون‌های جدید، مرور نامگذاری تاکسون‌ها، طبقه‌بندی تاکسون‌ها، معرفی روش‌های جدید ایجاد و تحلیل داده‌ها، ژن‌اکولوژی، ژنتیک جمعیت‌ها و تنوع وراثتی، تنوع زیستی و فیلوژنی تاکسون‌ها، مقاله‌های اصیل پژوهشی را به صورت مقاله کامل (Full Paper) و مقاله کوتاه (Short Paper) پس از داوری دقیق به چاپ می‌رساند.

پیش از ارسال مقاله، روش تدوین و نگارش مقاله خود را به دقت با مطالب زیر مطابقت فرمایید.

نکات قابل توجه

- ۱- در مقاله، قواعد دستور زبان فارسی و رسا بودن جملات مورد توجه ویژه قرار گیرد.
- ۲- مقالاتی که برای چاپ در این مجله ارسال می‌گردد نباید قبلاً چاپ شده باشد (مگر در شکل خلاصه در گردهمایی‌ها) همچنین نباید به طور همزمان برای چاپ به مجلات دیگر ارایه شده باشد.
- ۳- مسؤلیت مطالب مندرج در مقاله بر عهده نویسنده یا نویسندگان مقاله است.
- ۴- مجله در قبول، رد و اصلاح مقاله‌ها آزاد است.
- ۵- استفاده از مندرجات مجله با ذکر مأخذ آزاد است.
- ۶- مقاله‌های دریافتی توسط هیأت تحریریه با همکاری متخصصان امر داوری می‌گردد و در صورت تصویب با رعایت نوبت به چاپ می‌رسد. تصمیم نهایی برای چاپ مقاله توسط هیأت تحریریه صورت می‌گیرد.

نحوه تدوین مقاله

- ۱- مقاله بایستی به زبان فارسی تهیه شود (به استثناء مقاله‌های پژوهشگران خارجی که باید به زبان انگلیسی باشد) و هر مقاله باید یک چکیده به زبان انگلیسی داشته باشد؛ این شرط تا زمانی که زبان مجله تغییر نکرده است پا برجا خواهد بود.
- ۲- هر مقاله علمی - پژوهشی بایستی به ترتیب دارای قسمت‌های: عنوان، مشخصات مؤلف یا مؤلفان و نشانی دقیق همراه با شماره تلفن و نشانی پست الکترونیک فرستنده (مسئول مکاتبات)، چکیده فارسی، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج، بحث، جمع‌بندی، قدردانی، منابع، Abstract و Key words باشد.
- ۳- تایپ مقاله با نرم‌افزار Microsoft Office Word 2003، به صورت یک رو، در کاغذ A4، با حاشیه‌های متن ۳ سانتی‌متر و به صورت یک ستونی و با فاصله خطوط ۱ سانتی‌متر (single) انجام شود.
- ۴- مقاله نباید از ۱۵ صفحه چاپ شده در مجله (حدود ۶ هزار کلمه) تجاوز کند.
- ۵- از درج پاورقی برای بیان توضیحات انگلیسی و فارسی و برعکس خودداری شود و در صورت نیاز در درون پرانتز و در متن مقاله آورده شود.
- ۶- شکل‌ها و جدول‌ها شماره‌گذاری شده و به همراه زیرنویس آنها در متن مقاله آورده شود؛ در نرم‌افزار Word، فرمت شکل‌ها در بخش Text Wrapping، به صورت In line with text انتخاب شود. از ارسال شکل‌های گروه‌بندی شده (Group) اکیداً خودداری شود؛ نمودارها به صورت دو بعدی و سیاه و سفید طراحی شوند و الزاماً از حالت سه بعدی خارج شوند.

عنوان: شامل کوتاه‌ترین عبارتی خواهد بود که به طور کلی گویای محتوای مقاله باشد، خط فارسی عنوان 16 B Lotus Bold و انگلیسی 14 Times New Roman Bold است.

نام و نشانی نگارندگان: مسؤولیت ترتیب نام نگارندگان بر عهده نویسنده مسؤول خواهد بود. درج شماره مربوط به نشانی هر نگارنده پس از نام نگارنده به صورت بالا نویس (Superscript) است؛ علاوه بر درج شماره مربوط، یک ستاره برای نام نویسنده مسؤول (Corresponding Author) درج شود. نشانی‌ها به ترتیب و با خط 12 B Lotus Bold و 11 Times New Roman Bold در زیر نام نویسندگان ذکر می‌گردد. نشانی پست الکترونیک مسؤول مکاتبات با خط 10 Times New Roman Bold نوشته شود.

نمونه فارسی

معرفی گونه‌ای جدید در جنس *Centaurea* از ایران
علیرضا اسدی^{۱*}، محمد کیانی^۲ و شهریار نظری^۲
^{۱*} دانشگاه اصفهان گروه زیست‌شناسی، ^۲ مرکز تحقیقات زیستی
asadi-a.r@ui.ac.ir*

چکیده: خط 11 B Lotus و 10 Times New Roman شامل ۱۰۰ تا ۲۵۰ کلمه و بدون هر گونه کلمه اختصاری

واژه‌های کلیدی: حداکثر حاوی شش کلمه مرتب شده بر اساس حروف الفبا

مقدمه، مشاهدات، مواد و روش‌ها، نتایج، بحث و نتیجه‌گیری، قدردانی و منابع: 11 Times New Roman و 13 B Lotus

Abstract و **Key words:** 12 Times New Roman

عنوان جدول در بالای جدول و عنوان شکل (شامل نمودار، تصویر، دیاگرام، گراف، ...) در زیر آنها نوشته شود.

11 B Lotus و 9 Times New Roman

نمونه: شکل ۱-، شکل ۲-، جدول ۱-، جدول ۲-

نحوه مرجع‌دهی:

الف) مرجع‌دهی در متن (**References in text**): در متن به صورت نام نویسنده و یا نویسندگان (بدون نام کوچک) و سال انتشار نوشته شود.

نمونه فارسی: یک نویسنده: (بهارلو، ۱۳۸۸)، دو نویسنده: (قاسم‌زاده و اشتری، ۱۳۶۵)، سه نویسنده و بیشتر: (شریعت‌مدار و همکاران، ۱۳۷۶)

نمونه انگلیسی: یک نویسنده: (Davis, 1985)، دو نویسنده: (Dagan and Zohary, 1970)، سه نویسنده و بیشتر: (Johnson et al., 2000)

کلمه *et al.* بایستی به صورت مورب باشد (این کلمه لاتین است).

ب) مرجع‌دهی در بخش منابع (**References list**): فهرست منابع بایستی به ترتیب حروف الفبا مرتب شده ابتدا منابع فارسی و سپس منابع خارجی آورده شود.

ب-۱) مرجع‌دهی به مقاله (**Paper**): به ترتیب شامل: نام نویسنده یا نویسندگان، سال، عنوان، نام کامل مجله، شماره مجلد، شماره صفحات.

ب-۱-۱) مقاله با یک نگارنده

نمونه فارسی: بحرانی، ص. (۱۳۷۵) بررسی گوناگونی ژنتیکی در گونه‌های وحشی (*T. urartu* and *T. boeoticum*) با استفاده از الکتروفورز پروتئین بذر. مجله بذر و نهال ۲: ۱-۹.

نمونه انگلیسی:

- Noda, K. (1981) C-banding technique for Wheat chromosomes. Wheat Information Service 52(8): 29-31.

ب-۱-۲) مقاله با دو نگارنده:

نمونه فارسی: ولی پور، ع. و حسینی، ا. (۱۳۷۶) بررسی پراکنش گیاهان مقاوم به شوری در ایران. مجله زیست‌شناسی ۳(۵): ۷۵ - ۹۱.

نمونه مثالی انگلیسی:

- Baum, B. R. and Appels, R. (1992) Evolutionary change at the 5s DNA loci of species in the Triticaceae. *Plant Systematics and Evolution* 183: 195-208.

ب-۱-۳) مقاله با سه نگارنده و بیشتر:

نمونه فارسی: ولی پور، ع.، حسینی، ا. و امینی، ا. ر. (۱۳۷۶) بررسی پراکنش گیاهان مقاوم به شوری در ایران. مجله زیست‌شناسی ۳: ۷۵ - ۹۱.

نمونه انگلیسی:

- Jain, S. K., Qualset, C. O., Bhatt, G. M. and Wu, K. K. (1975) Geographical patterns of phenotypic diversity in a world collection of durum wheats. *Crop Science* 15: 404-700.

ب-۲) مرجع دهی به کتاب (Book): به ترتیب شامل: نام نویسنده یا نویسندگان، سال، عنوان کتاب، شماره Edition

در صورت وجود، نام مؤسسه انتشاراتی، نام اولین شهری که انتشار در آن انجام گرفته است.

نمونه فارسی: مظفریان، و. (۱۳۷۳) کورموفیت‌های ایران. جلد ۴، مرکز نشر دانشگاهی، تهران.

نمونه انگلیسی:

- Stace, C. A. (1989) *Plant Taxonomy and Biosystematics*. Edward Arnold, London.
- Rice, E. L. (1984) *An Introduction to Microbiology*. 2nd ed., Academic Press, New York.

مرجع دهی به ترجمه فارسی کتاب:

استیس، سی. ای. (۱۳۷۵) تاکسونومی گیاهی و سیستماتیک زیستی. ترجمه خسروی، الف. انتشارات دانشگاه شیراز، شیراز.

ب-۳) مرجع دهی به بخشی از کتاب (Chapter in Book) که هر بخش دارای نویسنده جداگانه باشد:

نمونه انگلیسی:

- Morrison, L. A. (1993) *Triticum-Aegilops systematics: taking an integrative approach*. In: *Biodiversity and Wheat Improvement* (ed. Damania, A. B.) 59-66. John Wiley & Sons, New York.
- Sears, E. R. (1956) The systematic, cytology and genetics of wheat. In: *Handbuch der Pflanzenzuchtung*. (eds. Kapparet, H. and Rudorf, W.) 2: 164-187. Paul Parey, Berlin and Humburg.

ب-۴) مرجع دهی به پایان‌نامه کارشناسی ارشد یا دکترا: نام نویسنده، سال، عنوان پایان‌نامه، مقطع تحصیلی، نام دانشگاه، نام شهر، نام کشور.

نمونه فارسی: حسین پور، م. (۱۳۶۵) تاکسونومی و بیوسستماتیک جنس *Cardaria* L. در ایران. رساله دکتری، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

نمونه مثالی انگلیسی:

- Hassanpour, S. M. (2006) Study of Biosystematic of the genus *Rhamnus*. Ms.c. Thesis, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

ب-۵) مرجع دهی به Patent:

- Suzuki, T., Ohishi, N. and Yagi, K. (2000) Methods of obtaining a composition 9-cis β -Carotene in high purity. US Patent 6057484.

ب-۶) مرجع دهی به همایش‌ها (سمینارها، سمپوزیوم‌ها، کنگره‌ها، میتینگ‌ها و ...): به ترتیب شامل: نام نویسندگان، سال انتشار، عنوان مقاله، دوره و نام همایش، محل برگزاری، شهر، کشور.

نمونه فارسی: رنگی پور، ا.، افشارزاده، س.، بلالی‌دهکردی، غ. ر. و صاحبی، ج. (۱۳۸۷) مطالعه جنس لویی در رودخانه زاینده‌رود. اولین همایش ملی زیست‌شناسی گیاهی، دانشگاه پیام نور، تالش، ایران.

نمونه انگلیسی:

- Mason-Gamer, R. J. and Helfgott, D. M. (2002) Molecular phylogenetic investigation of allopolyploid *Elymus* in North America. 4th International Triticeae Symposium, Prague, Czech Republic.
- ب-7) مرجع دهی به مقاله های کامل همایش ها (سمینارها، سمپوزیوم ها، کنگره ها، میتینگ ها و ...) (Proceedings):
به ترتیب شامل: نام نویسندگان، سال انتشار، عنوان مقاله، دوره و نام همایش، محل برگزاری، شهر، کشور.
نمونه فارسی: صفوی، و. و شریعتی، م. (۱۳۸۶) تأثیر الیسیتور متیل جاسمونات بر سنتز بتاکاروتن در جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina*. مجموعه مقالات دومین همایش ملی زیست شناسی سلولی و ملکولی، کرمان، ایران.
نمونه انگلیسی:
- Mohsenzadeh, S. (1996) Study of nitrogen fertilizer time and amount on seed production and other characterizations of Sorghum. In: Proceeding of the 4th Iranian Congress of Agriculture and Plant Breeding, Isfahan, Iran.
 - Shariati, M. and Lilley, R. McC. (1993) Triggering of glycerol synthesis in *Dunaliella tertiolecta* at constant osmotic pressure. 33rd Annual General Meeting of Australian Society of Plant Physiologist. Perth, Australia.
- ب-8) مرجع دهی به اینترنت: مرجع دهی به نشانی های اینترنتی تقریباً فاقد اعتبار بوده و پیشنهاد می شود استفاده نگردد.
در مواقعی که ناگزیر از استفاده محدود از آن باشد نام نویسنده، زمان چاپ و در انتها نیز زمان استخراج از اینترنت درج گردد.
نمونه:
- Rotblat, J. (2000) Fifty Pugwash conferences: a tribute to Eugene Rabinowitch. Retrieved from <http://www.pugwash.org/reports/pac/pac256/otblat.htm>. On: 22 June 2001.
- پ) شکل ها و جدول ها: شکل ها و جدول ها به ترتیب ذکر شده درون متن قرار بگیرند، توضیحات شکل ها در پایین و توضیحات جدول ها در بالای آنها نوشته شود.

درستی نام علمی گونه های گیاهی از لحاظ صفت گونه ای و نام آتور در پایگاه جهانی فهرست نام های گیاهی

www.ipni.org بررسی شود.

نحوه ارسال مقاله

مقالات به صورت فایل word نسخه ۲۰۰۳ (با نام و نشانی نویسندگان، بدون نام و نشانی نویسندگان، فرم کپی رایت) به پایگاه اختصاصی مجله <http://uijs.ui.ac.ir/tbj> ارسال گردد.

تماس با ما

نشانی پستی: اصفهان - خیابان هزار جریب - دانشگاه اصفهان - ساختمان کتابخانه مرکزی - طبقه دوم

اداره چاپ، انتشارات و مجلات - دفتر مجله تاکسونومی و بیوسیستماتیک، کدپستی: ۸۱۷۴۶۷۳۴۴۱

شماره تماس: ۰۳۱۱-۷۹۳۴۲۵۵، دورنگار: ۰۳۱۱-۷۹۳۲۱۷۷

نشانی پست الکترونیک: tbj@ui.ac.ir

پایگاه اختصاصی: <http://uijs.ui.ac.ir/tbj>

معرفی داوران علمی

سال پنجم - شماره چهاردهم - بهار ۱۳۹۲

اعضای محترم هیأت علمی دانشگاه‌ها و مؤسسات آموزشی و پژوهشی کشور که در داوری و ارزیابی مقالات این شماره از مجله علمی- پژوهشی تاکسونومی و بیوسیستماتیک همکاری داشته‌اند، معرفی شده، از خدمات علمی آنها تقدیر می‌گردد:

دانشگاه کردستان	دکتر مراسم آشنکرف
مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه	دکتر نسترن جلیلیان
دانشگاه شهرکرد	دکتر نواز خرازیان
دانشگاه شیراز	دکتر احمدرضا خسروی
دانشگاه صنعتی اصفهان	دکتر سالار درافشان
دانشگاه شهرکرد	دکتر مجید شریفی تهرانی
مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور	دکتر مجید عسکری سیاهویی
دانشگاه خلیج فارس بوشهر	دکتر سید احمد قاسمی
دانشگاه زابل	دکتر احمد قرایی
دانشگاه تهران	دکتر محمد کابلی
دانشگاه شهید بهشتی	دکتر محمدرضا کنعانی
دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر	دکتر سعید کیوان شکوه
پژوهشگر	دکتر مجید مرادمند
دانشگاه گیلان	دکتر محمدجواد مهدی‌پور مقدم
دانشگاه علوم پزشکی اصفهان	دکتر حمید میرمحمد صادقی
دانشگاه شهرکرد	دکتر ایرج هاشم‌زاده سقرلو

مجله علمی - پژوهشی تاکسونومی و بیوسیستماتیک

سال پنجم - شماره چهاردهم - بهار ۱۳۹۲

شماره استاندارد بین‌المللی (چاپی): ۲۰۰۸-۸۹۰۶

شماره استاندارد بین‌المللی (الکترونیک): ۲۳۲۲-۲۱۹۰

فهرست

- بررسی تغییرات شکل بدن در جمعیت‌های ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldii* De Filippii, 1863) در حوضه دریای خزر با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی ۸-۱
سهیل ایگدری، اسماعیل اسماعیل زادگان و عالیه مداح
- ارزیابی ساختار ژنتیک جمعیت سیچلید ایرانی (*Iranocichla hormuzensis*) به عنوان تنها گونه بومی از خانواده سیچلیده در ایران، با نشانگر ریزماهواره ۱۶-۹
زهرآ قصاب شیران، سالار درافشان و یزدان کیوانی
- بررسی تأثیر رقابت اسپرم بر تنوع ژنتیکی نتاج قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ۳۴-۱۷
حسین مرادیان، سعید کیوان شکوه، مصطفی محقق دولت‌آبادی و عین‌اله گرجی‌پور
- حفظ چندشکلی نشانگرهای ژن *GJB2* در جمعیت ایرانی به واسطه انتخاب متعادل ۴۰-۳۵
حلیمه رضایی، زهرا فاضلی عطار، مرجان مجتبی نائینی و صادق ولیان بروجنی
- بررسی تاکسونومی عددی *Trifolium resupinatum* L. (شبدر ایرانی) و *Trifolium fragiferum* L. (شبدر توت‌فرنگی) با استفاده از ریزماهواره‌های جدید ۵۲-۴۱
مریم حائری نسب و پیمان آفایی
- مطالعه تبارشناسی داده‌های ریخت‌شناختی و ارزیابی روند تکاملی این صفات در جنس کمای (*Ferula* L.) ایران ۶۶-۵۳
محمد رضا کنعانی، محمد رضا رحیمی نژاد رنجبر، شاهرخ کاظم‌پور اصلو و ولی‌اله مظفریان
- مطالعه فلور منطقه ریشه و پاقلعه شهرستان شهربابک استان کرمان ۷۸-۶۷
عاطفه صابری، زهرا حسن‌آبادی، سید منصور میرتاج‌الدینی و وحیده ناظری
- جداسازی و شناسایی باکتری‌های پلی‌اکستریموفیل قلیادوست، نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک تالاب قلیایی شور-دریایی گمیشان ۱۰۰-۷۹
آزاده شاهین‌بی، محمد علی آموزگار و عباس اخوان سپهی

بررسی تغییرات شکل بدن در جمعیت‌های ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldii* De Filippii, 1863) در حوضه دریای خزر با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی

سهیل ایگدری، اسماعیل اسماعیل زادگان و عالیه مداح
گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی تغییرات شکل بدن جمعیت‌های مختلف ماهی خیاطه در حوضه دریای خزر با استفاده از ریخت‌سنجی هندسی بر پایه لندمارک است. نتایج تحقیق حاضر می‌تواند به درک بهتر الگوی تغییرپذیری ریختی و تکامل در حال پیشرفت این ماهیان در توده‌های آبی سیستم‌های رودخانه‌ای مختلف حوضه خزر کمک نماید. تعداد ۲۶۰ نمونه ماهی خیاطه از چهار رودخانه گرگانرود در بخش شرقی، رودخانه ولمرود در بخش میانه و دو شاخه رودخانه سفیدرود در بخش غرب حوضه دریای خزر نمونه‌برداری شد. از سمت چپ سطح جانبی نمونه‌ها عکس‌برداری گردید. تعداد ۱۸ نقطه لندمارک بر روی تصاویر دو بعدی حاصل، تعیین گردید، سپس، با نرم‌افزار TpsDig2 بر روی آنها قرار داده شد. داده‌های حاصل پس از آنالیز پروکراست، با روش‌های آماری چند متغیره PCA، CVA و آنالیز خوشه‌ای تحلیل شدند و سپس الگوهای تغییر شکل هر جمعیت نسبت به شکل اجماع (میانگین همه جمعیت‌ها) در شبکه تغییر شکل مصورسازی گردید. تفاوت معنی‌داری بین شکل بدن جمعیت‌های مطالعه شده ماهی خیاطه به جز دو جمعیت متعلق به رودخانه سفیدرود یافت شد ($P < 0.05$). نتایج جدایی ریختی وابسته به زیستگاه، تغییرپذیری ریختی و تکامل در حال پیشرفت شکل بدن جمعیت‌های مختلف و تا حدودی ارتباط بین فاصله جغرافیایی و تمایز ریختی ماهی خیاطه را تحت تأثیر شرایط محیطی رودخانه‌های محل زیست در حوضه دریای خزر نشان داد. از این رو، نتایج نشان می‌دهد که هر جمعیت این گونه باید به عنوان یک ذخیره ژنتیکی و ریخت‌شناختی مجزا در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: تغییرپذیری ریختی، ریخت‌سنجی هندسی، سفیدرود، گرگانرود، ولمرود

محیطی سازگار شوند (Nacua et al., 2010). عوامل

محیطی به عنوان نیروی قدرتمند در شکل‌دهی ریخت

مقدمه

ماهیان قادرند برای ادامه حیات با شرایط مختلف

رودخانه‌های مختلف حوضه دریای خزر، این پرسش مطرح است که آیا شکل بدن جمعیت‌های مختلف این گونه در توده‌های آبی این حوضه تغییر یافته است که بتواند به عنوان الگویی از تغییرپذیری ریختی و تکامل در حال پیشرفت، تحت تأثیر عوامل محیطی در نظر گرفته شود. از اینرو، این بررسی با هدف مقایسه شکل بدن جمعیت‌های مختلف ماهی خیاطه در حوضه دریای خزر با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی به اجرا درآمد.

مواد و روش کار

جایگاه‌های نمونه‌برداری: در مجموع، تعداد ۲۶۰ قطعه ماهی خیاطه از چهار رودخانه گرگانرود شامل رودخانه‌های مادرسو (E: 55°50', N: 37°23') (۴۰ قطعه)، پیشکمر (E: 55°50', N: 37°35') (۳۰ قطعه)، چهل‌چای (E: 55°40', N: 37°22') (۴۰ قطعه) و زرین‌گل (E: 55°58', N: 36°50') (۴۰ قطعه) رودخانه ولمرود (در شهرستان تنکابن) (E: 50°50', N: 36°44') (۵۶ قطعه) در بخش میانه حوضه دریای خزر و دو سرشاخه رودخانه سفیدرود شامل رودخانه‌های گیلهرود (E: 49°47', N: 37°08') (۳۶ قطعه) و شهربیجار (E: 49°38', N: 37°00') (۲۸ قطعه) در بخش غرب حوضه دریای خزر، توسط دستگاه الکتروشوکر (۲۲۰ ولت) صید شدند. ماهیان صید شده پس از بیهوشی در محلول گل میخک، در فرمالین بافر ۱۰ درصد تثبیت شدند و سپس برای ادامه مطالعات به آزمایشگاه زیست‌شناسی آبزیان دانشگاه تهران منتقل شدند. برای کاهش تغییرات شکل بدن ناشی از رشد آلومتریکی، فقط نمونه‌های بالغ و بزرگتر از ۷۵ میلی‌متر انتخاب شدند.

موجودات در طی فرآیند فردزایی (تکامل فردی) شناخته شده است (Costa and Cataudella, 2007). شکل بدن شاخصی مهم برای رفتارهای شناگری و انتخاب زیستگاه در ماهیان است (Webb, 1982). از اینرو، شکل بدن نه تنها انعکاس‌دهنده ویژگی‌های ژنتیکی است بلکه می‌تواند منعکس‌کننده وضعیت محیط زندگی و زیستگاه ماهی نیز باشد (Guill et al., 2003). برای مثال، ماهیانی که در آب جاری مثل رودخانه زیست می‌کنند دارای بدنی دوکی شکل و ماهیان آب‌های ساکن دارای بدنی پهن و فشرده از دو طرف هستند (Haas et al., 2011; Ostrand et al., 2001).

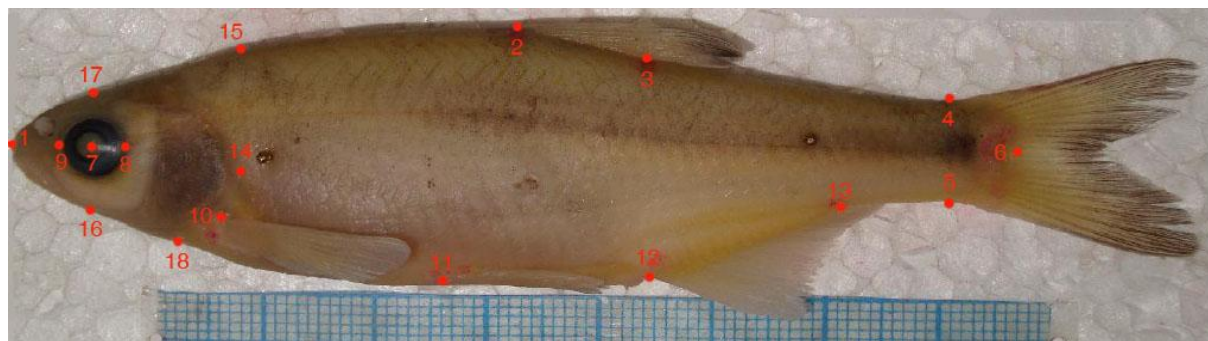
ماهیان یک گونه به واسطه جداسازی زیستگاه جمعیت‌های متفاوتی را تشکیل می‌دهند، در واقع، به واسطه ویژگی‌های آن محیط، طی فرآیند سازگاری، دچار تغییرات ریختی متفاوتی شده، از سایر جمعیت‌های آن گونه متمایز می‌شوند (Wootton, 1991). چنین وضعیتی ممکن است در مورد ماهیان رودخانه‌های مختلف حوضه دریای خزر از جمله ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldii* De Filippii, 1863) که کاملاً از یکدیگر جدا شده‌اند نیز مشاهده شود. ماهی خیاطه (*A. eichwaldii*) به طور عمده در نه‌های کوچک و کمتر در رودخانه‌های بزرگ ایران یافت می‌شود. این گونه، به همراه سیاه‌ماهی (*Capoeta capoeta*) از جمله فراوان‌ترین گونه‌های رودخانه‌های حوضه دریای خزر است (Coad, 2012). اعضای این گونه در رودخانه‌هایی با آب پُر اکسیژن و کمتر آلوده یافت می‌شوند و بسترهای سنگی را ترجیح می‌دهند (Abdoli, 2000; Coad, 2012).

با توجه به وضعیت پراکنش ماهی خیاطه در

روش مورد استفاده: روش ریخت‌سنجی

هندسی، روشی بر پایه مختصات لندمارک‌هاست که برای بررسی تغییرات شکل نمونه‌های مطالعه شده استفاده می‌گردد (Adams *et al.*, 2004). به طور معمول، در مطالعات ریخت‌سنجی سنتی آنالیزهای آماری چند متغیره برای بررسی مجموعه‌ای از داده‌های

فاصله‌ای از قبیل طول، عرض و ارتفاع به کار برده می‌شود، ولی در روش ریخت‌سنجی هندسی داده‌های حاصل، مختصات لندمارک‌هاست که برای استخراج داده‌های شکل استفاده می‌شوند. این داده‌های شکل می‌توانند در یک شبکه تغییر شکل (deformation grid) مصورسازی گردند (Adams *et al.*, 2004).



شکل ۱- لندمارک‌های تعیین شده بر روی نمونه ماهیان: ۱- ابتدایی‌ترین بخش پوزه در قسمت فک بالا، ۲- ابتدای قاعده باله پشتی، ۳- انتهای قاعده باله پشتی، ۴- قسمت بالایی بیشترین تورفتگی ساقه دم، ۵- قسمت پایینی بیشترین تورفتگی ساقه دم، ۶- انتهایی‌ترین بخش ساقه دم، ۷- وسط چشم، ۸- انتهای‌ترین نقطه چشم، ۹- ابتدایی‌ترین نقطه چشم، ۱۰- ابتدای‌ترین نقطه قاعده باله سینه‌ای، ۱۱- ابتدای‌ترین نقطه قاعده باله شکمی، ۱۲- ابتدای قاعده باله مخرجی، ۱۳- انتهای قاعده باله مخرجی، ۱۴- انتهایی‌ترین بخش سرپوش آبششی، ۱۵- خطی عمود با انتهای سرپوش آبششی به سمت بالای بدن، ۱۶- امتداد خطی موازی از لندمارک شماره ۷ به سمت پایین بدن، ۱۷- امتداد خطی موازی از لندمارک شماره ۷ به سمت بالای بدن، ۱۸- بخش زیرین سرپوش آبششی.

از سمت راست، سطح جانبی نمونه‌ها با استفاده از Copystand مجهز به دوربین دیجیتال Kodak با قدرت تفکیک شش مگاپیکسل عکس‌برداری شد. برای استخراج داده‌های شکل در روش ریخت‌سنجی هندسی تعداد ۱۸ لندمارک تعیین گردید (شکل ۱). لندمارک‌ها با نرم‌افزار TpsDig2 بر روی تصاویر دو بعدی قرار داده شدند. روی هم‌گذاری جایگاه لندمارک‌های نمونه‌ها با استفاده از آنالیز پروکراست (Generalised Procrustes Analysis) و حذف تغییرات غیرشکل (شامل: مقیاس، جهت و موقعیت) با نرم‌افزار tpsRelw انجام شد (Zelditch, 2004). سپس، داده‌های به‌دست آمده شکل بدن جمعیت‌های مورد مطالعه با آنالیزهای

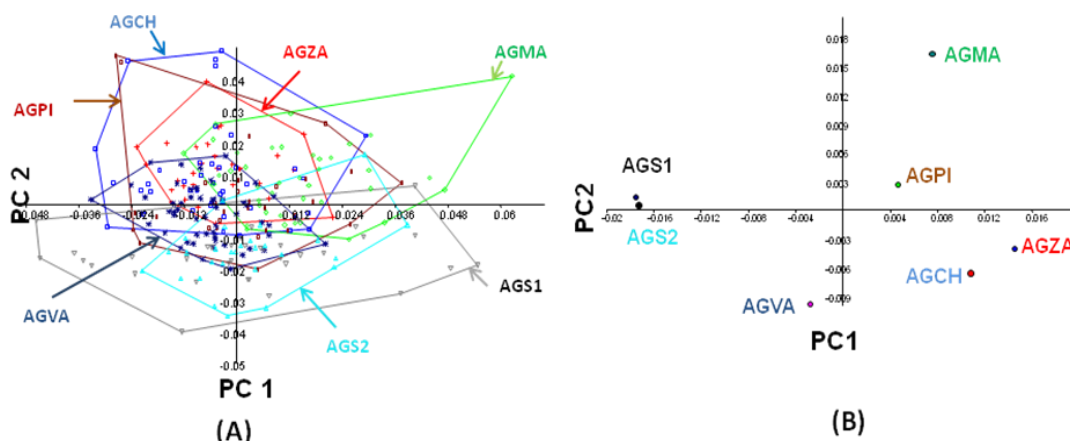
چندمتغیره تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA)، تجزیه همبستگی کانونی (CVA) و آنالیز خوشه‌ای توسط نرم‌افزار PAST نسخه ۲/۱۰ تحلیل شدند. مصورسازی تغییرات شکل بدن میانگین جمعیت‌ها نسبت به شکل میانگین کل (consensus configuration)، با نرم‌افزار tpsSpline نسخه ۲/۱۰، در شبکه تغییر شکل انجام شد. این مقایسه، بر اساس فاصله پروکراست است که سنجش استاندارد در بررسی تفاوت شکل در روش ریخت‌سنجی هندسی است (Rohlf, 2001). شبکه تغییر شکل، برای توصیف تغییرات شکل میان‌فرم‌های زیستی بوده، که در آن یک شکل مرجع مطابق با شکل هدف تغییر می‌کند (Adams *et al.*, 2004).

نتایج

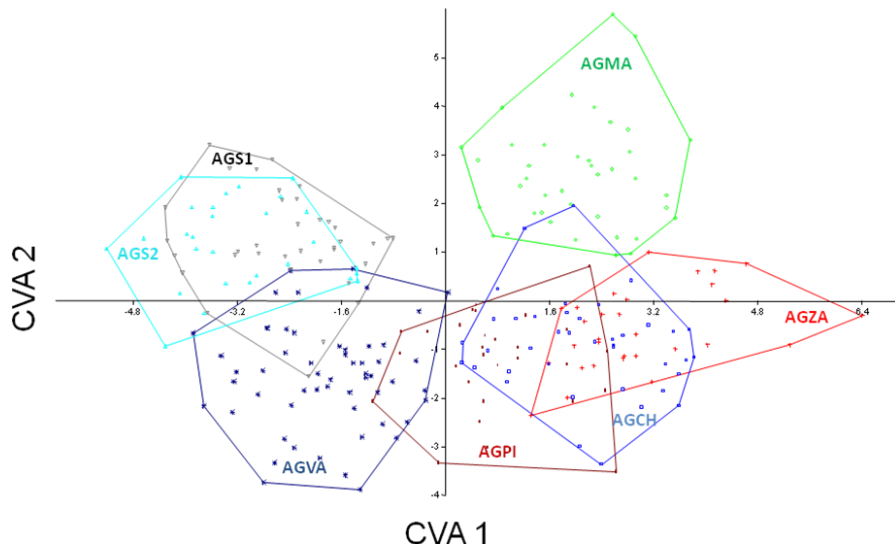
آنالیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تغییرات شکل بدن را در سه مؤلفه اصلی (PC) آشکار نمود. مؤلفه اصلی اول (PC1) مربوط به تغییر جایگاه لندمارک‌های مستقر در ناحیه سر و ساقه دم و مؤلفه‌های دوم و سوم (PC2 و PC3) مربوط به تغییر جایگاه لندمارک‌های مرتبط با عرض بدن بودند که در مجموع، ۵۳/۲ درصد از تغییرات قابل مشاهده را شامل می‌شدند (شکل ۲). آنالیز تجزیه همبستگی کانونیک (CVA) نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین شکل بدن جمعیت‌های مورد مطالعه ماهی خیاطه وجود دارد ($P < 0/05$) و تنها تفاوت شکل بدن دو جمعیت متعلق به رودخانه سفیدرود معنی‌دار نبود (شکل ۳). نتایج مصورسازی در شبکه تغییر شکل نشان داد که تفاوت شکل بدن جمعیت‌های مختلف ماهی خیاطه از الگوهای متنوعی تبعیت می‌کند (شکل ۴). بر اساس الگوی جابجایی لندمارک‌ها، شکل بدن نمونه‌های رودخانه سفیدرود با جمعیت‌های دیگر تفاوت بسیار معنی‌داری را نشان دادند ($P > 0/0001$). در نمونه‌های فوق، بیشترین جابجایی لندمارک‌ها مربوط به ناحیه سر و سرپوش آبششی بود. ماهیان این رودخانه دارای پوزه و

قطر چشم کوچکتر، ارتفاع سر کمتر و ساقه دمی درازتر بودند و همچنین، موقعیت باله سینه‌ای آنها نیز در جایگاه بالاتری بودند (شکل ۴).

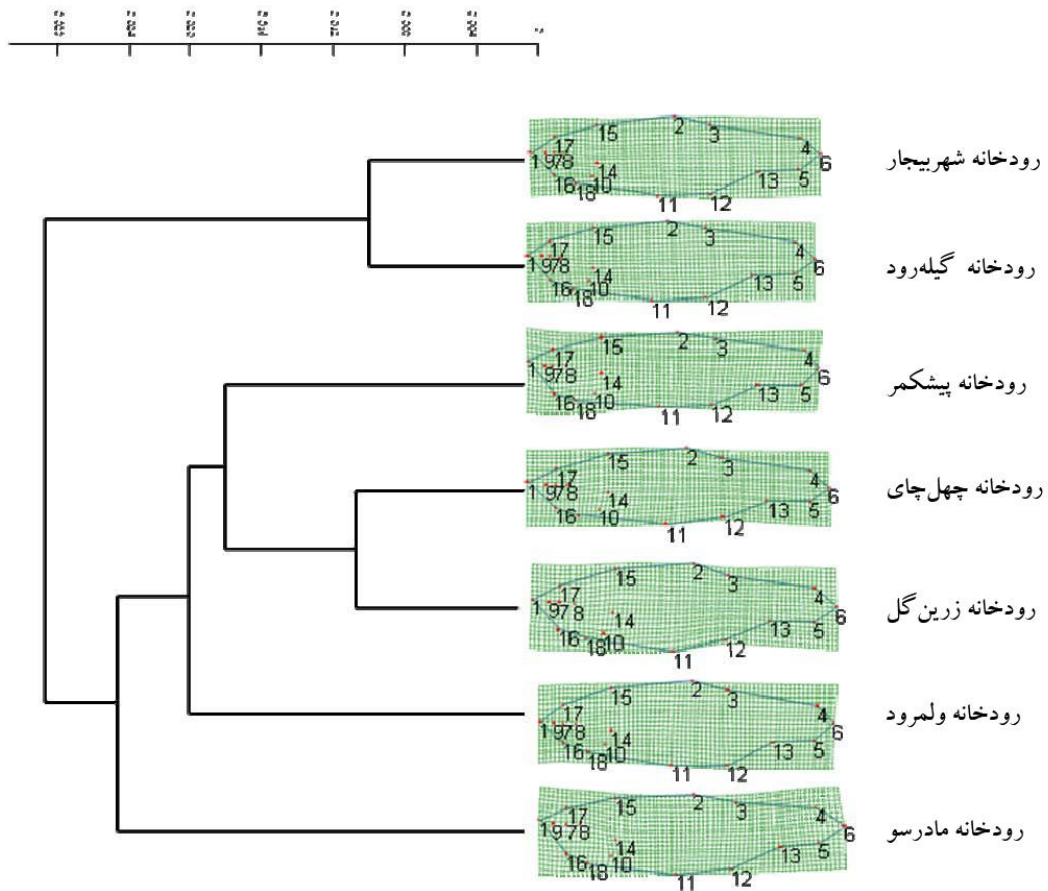
بر اساس الگوهای جابجایی لندمارک‌ها نمونه‌های رودخانه ولمرود دارای شکل بدن پهن و سری با ارتفاع کمتر بودند و در آنالیز خوشه‌ای با سایر جمعیت‌های رودخانه گرگانرود در یک شاخه قرار گرفتند (شکل ۴). مقایسه الگوهای شکل بدن با شکل میانگین نمونه‌ها نشان داد که نمونه‌های رودخانه مادرسو به دلیل کشیدگی لندمارک‌های ۲ و ۳ به طرف داخل، دارای بدنی با پهنای کمتر و دهانی در وضعیت بالاتر بودند (شکل ۴). نمونه‌های رودخانه‌های چهل‌چای و زرین‌گل هر دو دارای بدنی پهن و سر بزرگ با ارتفاع بیشتر بودند. تفاوت این دو جمعیت، داشتن ساقه دمی کوتاه‌تر در نمونه‌های رودخانه چهل‌چای و جا به جایی باله سینه‌ای به وضعیت شکمی در نمونه‌های رودخانه زرین‌گل است (شکل ۴). نمونه‌های رودخانه پیشکمر نیز دارای بدنی کم ارتفاع تر با سری بزرگتر و مرتفع بودند (شکل ۴).



شکل ۲- (A) نمودار آنالیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) شکل بدن جمعیت‌های ماهی خیاطه (*A. eichwaldii*) و (B) نمودار آنالیز PCA بر اساس شکل اجماع جمعیت‌ها. AGVA = رودخانه ولمرود، AGS1 = رودخانه گیله‌رود و AGS2 = رودخانه شهربیجار. AGCH = رودخانه چهل‌چای، AGPI = رودخانه پیشکمر، AGZA = رودخانه زرین‌گل، AGMA = رودخانه مادرسو، AGVA = رودخانه ولمرود، AGS1 = رودخانه گیله‌رود و AGS2 = رودخانه شهربیجار.



شکل ۳- نمودار CVA شکل بدن جمعیت‌های ماهی خیاطه (*A. eichwaldii*). AGPI = رودخانه پیشکمر گرگانرود، AGCH = رودخانه چهل‌چای گرگانرود، AGZA = رودخانه زرین‌گل گرگانرود، AGMA = رودخانه مادرسو گرگانرود، AGVA = رودخانه ولمرود، AGS1 = رودخانه گیلرود و AGS2 = رودخانه شهربیجار



شکل ۴- آنالیز خوشه‌ای شکل بدن جمعیت‌های مورد مطالعه ماهی خیاطه (*A. eichwaldii*)

بحث

نتایج بررسی حاضر نشان داد که شکل بدن جمعیت‌های مطالعه شده تغییر یافته است و این امر، جدایی ریختی وابسته به زیستگاه را در جمعیت‌های ماهیان خیاطه حوضه دریای خزر آشکار می‌سازد. در بسیاری از مطالعات نیز سازگاری به زیستگاه‌های متفاوت دلیل تفاوت شکل بدن بیان شده است (Hendry *et al.*, Robinson and Wilson 1994)؛ (McGuigan *et al.*, Langerhans *et al.*, 2003؛ 2002 Haas *et al.*, Nacua *et al.*, 2010؛ *al.*, 2003 2011).

نتایج همچنین، تغییرپذیری ریختی و تکامل در حال پیشرفت شکل بدن جمعیت‌های مختلف ماهی خیاطه را تحت تأثیر شرایط محیطی رودخانه‌های محل زیست در حوضه دریای خزر نشان داد و پیشنهاد می‌کند که ویژگی‌های زیستگاهی همراه با جدایی جغرافیایی از عوامل تعیین‌کننده تغییرات تکاملی است که به تغییر ویژگی‌های ریختی ماهیان موجود در آن منجر می‌شود. تفاوت‌های ریختی در موجودات چنانچه بتواند به صورت یک عملکرد در نتیجه سازگاری ترجمه گردد، می‌تواند با اهمیت باشد. در اکوسیستم‌های آبی چنین سازگاری‌هایی در نتیجه نیاز به سازش با نیروهای هیدرودینامیکی برای حفظ انرژی طی رفتارهای زیستی مرتبط است (Vogel, 1994; Nacua *et al.*, 2010). ماهی خیاطه در آب‌های جریان‌دار زیست می‌کنند و در چنین آب‌هایی برای برآوردن نیازهای زیستی خود نیازمند شنای فعال است (Huet, 1949; Lusk, 1995). جمعیت‌های ماهیان خیاطه در سرشاخه‌های رودخانه سفیدرود، به دلیل داشتن سر کوچکتر و ساقه دمی درازتر، دارای بدنی کشیده‌تر و بیشتر دوکی‌شکل

هستند. این شکل بدن، اصطکاک و شسته شدن در طی شنای آزاد در جریان‌های سریع نهرهای کم عمق رودخانه سفیدرود را کاهش می‌دهد (Blake, 1983)؛ (Burns *et al.*, Spoljaric and Reimchen, 2008؛ 2009 Haas *et al.*, 2011). ماهیان رودخانه با جریان سریع مادرسو نیز دارای بدنی کم ارتفاع تر بودند.

بدن پهن‌تر با سر بزرگ ماهیان رودخانه‌های چهل‌چای و زرین‌گل احتمالاً ناشی از سازگاری برای افزایش قابلیت مانور سریع است و این شکل بدن در شنای مداوم مثلاً برای یافتن غذا در محیط‌هایی با جریان کمتر مؤثر هستند (Blake, 1983)؛ (Spoljaric and Reimchen, 2008؛ Haas *et al.*, 2011). اعضای این گونه در رودخانه‌های فوق درون گودال‌ها و شکاف رودخانه‌ای که جریانی آرامتری داشتند، یافت شدند.

جایگاه نمونه‌برداری در رودخانه‌های زرین‌گل و پیشکمر، کوهستانی بودند. تفاوت شکل بدن جمعیت‌های مناطق کوهستانی و دشتی، حتی در گونه‌های یک رودخانه نیز نشان‌دهنده متفاوت بودن نوع سازگاری ماهیان با توجه به نوع زیستگاه (نهرهای سنگلاخی با جریان سریع در مقایسه با آب‌هایی با جریان کمتر) است. بسته به نوع زیستگاه، درجه حرارت و نوع جریان آب تعیین‌کننده شکل بدن در ماهی خیاطه گزارش شده است (Dadikyan, 1973). بنابراین، علاوه بر شدت جریان آب رودخانه، تفاوت دمای آب بین قسمت‌های بالادست و پایین‌دست نیز بر روی شکل بدن جمعیت‌های ساکن آن منطقه می‌توانسته تأثیرگذار باشد.

شکل بدن همچنین می‌تواند در موفقیت تغذیه و اجتناب از شکارچی نیز مؤثر باشد (Langerhans and Reznick, 2010). از اینرو، تفاوت شکل سر و

Langerhans و همکاران (۲۰۰۳) ارتباط فاصله جغرافیایی و تمایز ریختی در ماهیان را گزارش نموده‌اند. ماهیان پایین دست و بالادست رودخانه‌های گرگانود نسبت به ماهیان سه رودخانه مجزای دیگر، احتمالاً به یکدیگر بسیار نزدیکتر هستند، اما تفاوت زیاد خصوصیات ریختی رودخانه مادر سو نسبت به رودخانه ولمرود پیشنهاد می‌کند که برای معرفی زیرگونه‌ها و حتی گونه جدید در ماهیان خیاطه با استفاده از ویژگی‌های ریختی، بررسی‌های دقیق‌تری لازم است. جریان ژنی، نقش مهمی را در جمعیت‌های ماهی به ویژه در جمعیت‌هایی که در پایین دست و بالادست رودخانه‌ها زیست می‌کنند، ایفا می‌کند. با این وجود، تفاوت ریختی به واسطه سازگاری‌های محیطی می‌تواند نیازمند انعکاس در ژن نباشد بلکه این تغییرات ممکن است در نتیجه تغییرات فیزیولوژیکی و رفتاری باشد (Dynes *et al.*, 1999). چنین فرآیندی می‌تواند به ظهور یک زیرجمعیت از جمعیت اصلی منجر گردد (Booke, 1981). از این رو، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که هر جمعیت از این گونه باید به عنوان یک ذخیره مجزا که فرآیندهای تکاملی در آن در جریان است، در نظر گرفته شود.

ساختارهای آن و تغییر جایگاه باله سینه‌ای در نمونه‌های سفیدرود، ولمرود و رودخانه زرین گل نسبت به دیگر جمعیت‌ها احتمالاً مربوط به رفتار و نوع تغذیه است. Abdoli (۲۰۰۰) بیان نمود که ماهی خیاطه به مقدار زیاد از حشرات آبی تغذیه می‌کند ولی Treer و همکاران (۲۰۰۶) غذای غالب ماهی خیاطه در رودخانه ساوا (Sava) در کشور کرواسی را گیاهان آبی (Chlorophyceae و Bacillariophyceae) گزارش نموده‌اند. از اینرو، این احتمال وجود دارد که راهکار تغذیه‌ای جمعیت‌های مختلف متفاوت باشد. Hendry و همکاران (۲۰۰۲) علت تفاوت در اندازه سر و موقعیت چشم در ماهی سه خار (*Gasterosteus aculeatus*) را در تفاوت نحوه تغذیه بیان نموده‌اند. همچنین، در این ماهیان تغییر جایگاه باله سینه‌ای ممکن است برای افزایش قدرت مانور در مسیر جریان آب باشد. به هر حال، بررسی ارتباط بین حضور شکارچیان و نحوه تغذیه با شکل بدن جمعیت‌های ماهیان خیاطه در رودخانه‌های مختلف در پژوهش‌های آتی توصیه می‌گردد. نتایج تحقیق حاضر، همچنین تا حدودی ارتباط بین فاصله جغرافیایی و تمایز ریختی را نشان داد.

منابع

- Abdoli, A. (2000) The inland water fishes of Iran. Nature and Wildlife Meusume of Iran, Tehran.
- Adams, D. C., Rohlf, F. J. and Slice, D. E. (2004) Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'Revolution'. Italian Journal of Zoology 71: 5-16.
- Blake, R. W. (1983) Fish locomotion. Cambridge University Press, Cambridge.
- Booke, H. E. (1981) The conundrum of the stock concept-Are nature and nurture definable in fishery science? Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 38: 1479-1480.
- Burns, J. G., Di Nardo, P. and Rodd, F. H. (2009) The role of predation in variation in body shape in guppies *Poecilia reticulata*: a comparison of field and common garden phenotypes. Journal of Fish Biology 75: 1144-1157.
- Coad, B. (2012) Fresh water fishes of Iran. Retrieved from <http://www.briancoad.com/contents.htm>. On: 19 May 2012.

- Costa, C. and Cataudella, S. (2007) Relationship between shape and trophic ecology of selected species of Sparids of the Caprolace coastal lagoon (Central Tyrrhenian sea). *Environmental Biology of Fish* 78: 115-123.
- Dadikyan, M. G. (1973) Variability of the Armenian riffle minnow (*Alburnoides bipunctatus eichwaldi* (Filippi)) in relation to the altitude at which it occurs. *Journal of Ichthyology* 13: 68-78.
- Dynes, J., Magnan, P., Bernatchez, L. and Rodriguez, M. A. (1999) Genetic and morphological variation between two forms of lacustrine brook charr. *Journal of Fish Biology* 54: 955-972.
- Guill, J. M., Hood, C. S. and Heins, D. C. (2003) Body shape variation within and among three species of darters (Perciformes: Percidae). *Ecology of Freshwater Fish* 12: 134-140.
- Haas, T. C., Blum M. J. and Heins, D. C. (2011) Morphological responses of a stream fish to water impoundment. *Biology Letters* 6: 803-806
- Hendry, A. P., Taylor, E. B. and McPhail, J. D. (2002) Adaptive divergence and the balance between selection and gene flow: lake and stream stickleback in the misty system. *Evolution* 56: 1199-1216.
- Huet, M. (1949) Aperçu des relations entre la pente et les populations piscicoles des eaux courantes. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie* 11: 332-351.
- Langerhans, R. B. and Reznick, D. N. (2010) Ecology and evolution of swimming performance in fishes: predicting evolution with biomechanics. In: *Fish locomotion: an ecoethological perspective* (eds. Domenici, P. and Kapoor, B. G.) 200-248. Science Publishers Inc, Enfield.
- Langerhans, R. B., Layman, C. A., Langerhans, A. K. and DeWitt, T. J. (2003) Habitat-associated morphological divergence in two Neotropical fish species. *Biological Journal of Linnean Society* 80: 689-698.
- Lusk, S. (1995) Influence of valley dams on the changes in fish communities inhabiting streams in the Dyje drainage area. *Folia Zoology* 44: 45-56.
- McGuigan, K., Franklin, C. E., Moritz, C. and Blows, M. W. (2003) Adaptation of rainbow fish to lake and stream habitats. *Evolution* 57: 104-118.
- Nacua, S. S., Dorado, E. L., Torres, M. A. J. and Demayo, C. G. (2010) Body shape variation between two populations of the white goby, *Glossogobius giuris*. *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology* 5: 44-51.
- Ostrand, K. G., Wilde, G. R., Strauss, R. E. and Young, R. R. (2001) Sexual dimorphism in plains minnow, *Hybognathus placitus*. *Copeia* 2: 563-565.
- Robinson, B. W. and Wilson, D. S. (1994) Character release and displacement in fishes: a neglected literature. *American Nature* 144: 596-627.
- Rohlf, F. J. (2001) Comparative methods for the analysis of continuous variables: geometric interpretations. *Evolution* 55: 2143-2160.
- Spoljaric, M. A. and Reimchen, T. E. (2008) Habitat dependent reduction of sexual dimorphism in geometric body shape of Haida Gwaii threespine stickleback. *Biological Journal of the Linnean Society* 95: 505-516.
- Treer, T., Piria, M., Aničić, I., Safner, R. and Tomljanović, T. (2006) Diet and growth of spiralin, *Alburnoides bipunctatus* in the barbel zone of the Sava River. *Folia Zoology* 55: 97-106.
- Vogel, S. (1994) *Life in moving fluids*, 2nd ed., Princeton University Press, Princeton.
- Webb, P. W. (1982) Locomotor patterns in the evolution of actinopterygian fishes. *American Zoologist* 22: 329-342.
- Wootton, R. J. (1991) *Ecology of teleost fishes*. Chapman and Hall Ltd., London.
- Zelditch, M. (2004) *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Academic Press, New York.

ارزیابی ساختار ژنتیک جمعیت سیچلید ایرانی (*Iranocichla hormuzensis*) به عنوان تنها گونه بومی از خانواده سیچلیده در ایران، با نشانگر ریزماهواره

زهرا قصاب شیران، سالار درافشان* و یزدان کیوانی
گروه شیلات، دانشکده مهندسی منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

سیچلید ایرانی (*Iranocichla hormuzensis*)، تنها عضو خانواده سیچلیده در ایران، پراکنش نسبتاً وسیعی در حوضه هرمز از جمله رودخانه‌های مهران و چشمه خورگو دارد. مقایسه تنوع ژنتیکی ذخایر سیچلید ایرانی در چشمه خورگو و رودخانه مهران در استان هرمزگان با استفاده از چهار جفت آغازگر ریزماهواره (OS25، OS7، OS64 و OS7R) انجام شد. تمامی جایگاه‌های بررسی شده چندشکل بودند. میانگین تعداد آلل مشاهده شده در جمعیت چشمه خورگو ۵ و در جمعیت مهران ۵/۷۵ بود. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جمعیت چشمه خورگو ۰/۷۸ و ۰/۷۱ و در جمعیت مهران ۰/۶۰ و ۰/۶۸ بود. نتایج، انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در تمامی جایگاه‌ها به جز جایگاه OS7 در ناحیه چشمه خورگو و جایگاه‌های OS25 و OS7 در ناحیه مهران را نشان داد. تمایز ژنتیکی پایین بین جمعیت‌ها (۳ درصد) و تنوع ژنتیکی بالای درون جمعیت‌ها (۹۷ درصد) به همراه وجود جریان ژنی قابل توجه بین دو ناحیه (۱۰/۷۶ فرد در هر نسل) از دیگر نتایج این پژوهش بود. نتایج این تحقیق برای نخستین بار اطلاعاتی را در خصوص ساختار ژنتیک جمعیت سیچلید ایرانی ارائه نمود که می‌تواند به منظور حفاظت و بهره‌برداری از ذخایر این گونه مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، سیچلید ایرانی، *Iranocichla hormuzensis* ریزماهواره، هرمزگان

مقدمه

($>80\text{ppt}$) و گرم (۴۵ درجه سانتیگراد) است، دارد (عبدلی، ۱۳۷۸).

این گونه، از نظر ذخیره ژنتیکی، قابلیت رنگ‌پذیری بالا، مقاومت به شوری و نیز به لحاظ زینتی حایز اهمیت است و می‌تواند به عنوان منبع و ذخیره با ارزش جهت

تنها گونه بومی از خانواده سیچلیده (*Cichlidae*)، سیچلید ایرانی با نام علمی *Iranocichla hormuzensis*، Coad, 1982 است (شکل ۱). سیچلید ایرانی پراکنش نسبتاً وسیعی در حوضه هرمز، رودخانه‌های مهران، کل، میناب و چشمه خورگو که دارای آب‌های شور سطحی

جمعیت‌های وحشی اغلب ارزش حفاظتی قابل ملاحظه‌ای را به سبب سهم منحصر به فردشان در تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای دارا هستند (Hilborn *et al.*, 2003). با توجه به اهمیت ذخایر ژنتیکی بومی جهت استفاده از حداکثر تنوع در زمینه اصلاح ژنتیک، افزایش تلاش برای شناخت آنها ضروری است. علی‌رغم اهمیت سیچلید ایرانی به عنوان یک ذخیره بومی، تاکنون مطالعه‌ای در زمینه ارزیابی تنوع ژنتیکی این گونه انجام نشده است. امروزه استفاده از ابزارهای ژنتیکی به عنوان یک روش مفید در شناخت ذخایر جمعیت‌ها و نژادهای مختلف آبزیان به طور گسترده‌ای مورد توجه قرار گرفته است. لذا، در این بررسی از روش ریزماهوره جهت بررسی تنوع ژنتیکی و شناخت جمعیت‌های موجود سیچلید ایرانی در مناطق نمونه‌برداری (رودخانه مهران و چشمه خورگو) برای نخستین بار در ایران استفاده شد.



شکل ۱- سیچلید ایرانی نر رودخانه مهران (عکس از نگارندگان)

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از دو ایستگاه رودخانه مهران (۵۳"، ۰۳" N: ۲۷، ۱۰" N: ۴۷، ۵۵ E) و چشمه خورگو (۵۶"، ۲۹، ۲۷ N: ۲۷، ۴۴" E) که از مهم‌ترین مناطق پراکنش این گونه در استان هرمزگان هستند، صورت گرفت (شکل ۲). از هر یک از ایستگاه‌ها تعداد ۳۰

تولید در آب‌های شور داخلی مطرح باشد. از لحاظ ویژگی‌های تولیدمثلی، سیچلید ایرانی مانند سایر سیچلیدها یک ماهی مراقبت‌کننده محسوب می‌شود. تولیدمثل سیچلید ایرانی از اسفند تا مرداد ماه (حداکثر در اردیبهشت ماه) با نسبت جنسی ۱F:۱/۴۴M صورت می‌گیرد. میانگین طول استاندارد در این گونه ۶۳ میلی‌متر گزارش شده است (Esmaeili *et al.*, 2009).

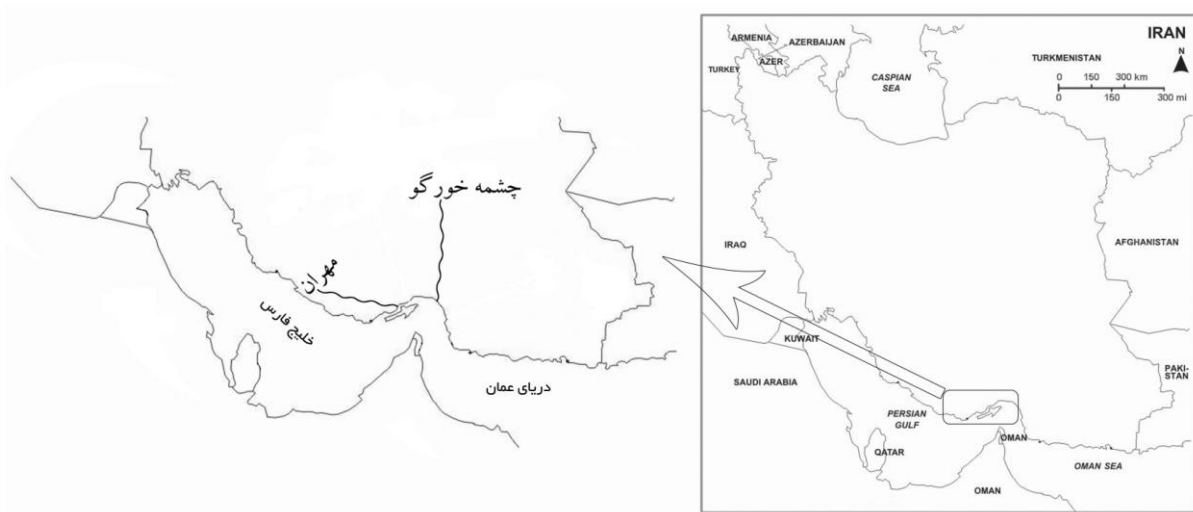
سیچلید ایرانی از لحاظ فیلوژنی شباهت نزدیکی به گونه جنس‌های *Dnakilia*، *Trisramella* و *Sarotherodon* دارد (Nelson, 2006). همچنین، در بررسی سیتوژنتیک جمعیت سیچلید ایرانی در رودخانه مهران، تعداد کروموزوم‌های دیپلوئید این گونه مشابه گونه‌های *Trisramella simonies* و *Sarotherodon galliaeus* (۲n=۴۴) گزارش شد که می‌تواند بیانگر شباهت فیلوژنی آنها باشد (Esmaeili *et al.*, 2006).

با وجود اهمیت زیستی و اقتصادی این گونه در ایران، تاکنون مطالعات اندکی در خصوص ویژگی‌های زیستی، تولیدمثلی و ساختار ژنتیک جمعیت این گونه اجرا شده است (گنجعلی، ۱۳۸۴؛ Esmaeili *et al.*, 2006).

مطالعات جمعیت‌شناسی گام بزرگی در راه شناخت جمعیت‌های آبزیان به شمار می‌رود و با به کارگیری شیوه‌های مختلف در شناخت جمعیت‌ها، می‌توان کمک شایانی در بهره‌برداری مناسب از ذخایر آبزیان و حفظ و بهبود ذخایر آنها نمود (Cadrin, 2000). مطالعات ژنتیک جمعیت به درک ما از چگونگی جدایی ژنتیکی گونه‌ها به جمعیت‌های مجزای تولیدمثلی، در گستره زیستگاهی آنها کمک می‌کند. چنین دانشی از نظر زیستی مهم است، چرا که

آمونیم استفاده شد (Fevolden and Pogson 1997). DNAهای استخراج شده، پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. کیفیت DNA استخراجی با استفاده از روش الکتروفورز با ژل آگاروز ۱ درصد تعیین گردید.

قطعه سیچلید ایرانی به منظور مطالعات مولکولی به روش تور احاطه‌ای صید شد. نمونه‌گیری از بافت نرم باله دمی و عضله ماهی انجام گرفت. برای این منظور، مقدار ۲-۳ گرم از بافت نرم باله دمی یا عضله ماهی داخل تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی الکل ۹۶ درصد قرار داده شد. برای استخراج DNA، از روش استات



شکل ۲- موقعیت تقریبی رودخانه‌های مطالعه شده در این پژوهش

تگ DNA پلیمرز ساخت شرکت سیناژن ($5\mu/\mu\text{L}$)، $2/5$ میکرولیتر بافر 10X PCR، $0/7$ میکرولیتر MgCl_2 و آب مقطر تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک سیکل در دمای ۹۴ به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل در دمای ۹۴ به مدت یک دقیقه، در دمای ۵۳-۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه (بسته به نوع آغازگر)، سپس در دمای ۷۲ به مدت ۴۵ ثانیه و در پایان یک سیکل در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول واکنش در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری و برای آشکارسازی از ژل پلی آکرلامید ۱۲ درصد همراه با رنگ آمیزی نترات نقره و نشانگر ۵۰bp ساخت شرکت Fermentas استفاده شد.

به علت عدم وجود آغازگر اختصاصی برای سیچلید ایرانی، جهت بررسی تنوع ژنتیکی بین دو جمعیت این ماهی، از چهار جفت آغازگر ریزماهواره چندشکل در *Oreochromis shiranus* که در سایر جنس‌های سیچلیده نظیر *Sarotherodon sp.* نیز چندشکل است، استفاده شد (جدول ۱) (Ambali et al., 2000؛ Appleyard et al., 2002).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای هر یک از آغازگرها انجام شد و بهترین دمای الحاق برای هر یک از آنها به دست آمد (جدول ۱). تکثیر جایگاه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتری و شرایطی شامل ۱ میکرولیتر DNA ($10\text{ ng}/\mu\text{L}$)، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (10 pM)، $0/5$ میکرولیتر dNTPs (10 mM)، $0/2$ میکرولیتر

مربوط به جایگاه OS7R و OS25 در هر دو ناحیه و حداکثر ۹ مربوط به جایگاه OS7 در ناحیه مهران) قرار داشت. متوسط تعداد آلل‌های مشاهده شده در مناطق چشمه خورگو و مهران به ترتیب ۵ و ۵/۷۵ به دست آمد (جدول ۳).

جدول ۲- نام جایگاه، محدوده بانندی، دمای بهینه اتصال و تعداد آلل مشاهده شده ماهی سیچلید ایرانی (*Iranocichla hormuzensis*)

ردیف	نام جایگاه	محدوده بانندی (جفت باز)	دمای بهینه اتصال (درجه سانتیگراد)
۱	OS7R	۷۸-۹۴	۵۴
۲	OS25	۷۶-۹۶	۵۳
۳	OS7	۱۰۴-۱۵۰	۵۹/۹
۴	OS64	۳۸-۶۸	۵۳/۹

جدول ۳- تعداد آلل واقعی و مؤثر، تنوع ژنتیکی و شاخص شانون چهار جایگاه مورد مطالعه در ماهی سیچلید ایرانی (*Iranocichla hormuzensis*)

میانگین	OS64	OS7	OS25	OS7R	جایگاه	شاخص
۵	۶	۶	۴	۴	N_a	
۳/۹۶	۵/۸۴	۴/۶۷	۲/۵۷	۲/۷۸	N_e	چشمه
۰/۷۸	۱	۱	۰/۹	۰/۲۳	H_o	خورگو
۰/۷۱	۰/۸۲	۰/۷۸	۰/۶۱	۰/۶۴	H_e	
۵/۷۵	۶	۹	۴	۴	N_a	
۳/۶۳	۴/۱۹	۵/۳۱	۳/۱۴	۱/۹۰	N_e	مهران
۰/۶۰	۰/۶۶	۱	۰/۶۰	۰/۱۶	H_o	
۰/۶۸	۰/۷۶	۰/۸۱	۰/۶۸	۰/۴۸	H_e	

آلل‌های مؤثر نیز در محدوده ۱/۹۰-۵/۸۴ آلل (حداقل ۱/۹۰ مربوط به جایگاه OS7R در ناحیه مهران و حداکثر ۵/۸۴ مربوط به جایگاه OS64 در ناحیه چشمه خورگو) قرار داشت. متوسط تعداد آلل‌های مؤثر در مناطق چشمه خورگو و مهران به ترتیب ۳/۹۶ و ۳/۶۳ بود (جدول ۳). دامنه H_o در بین نواحی

جدول ۱- آغازگرهای ریزماهوره از *Oreochromis shiranus* استفاده شده در این تحقیق (Ambali et al., 1999; 2000)

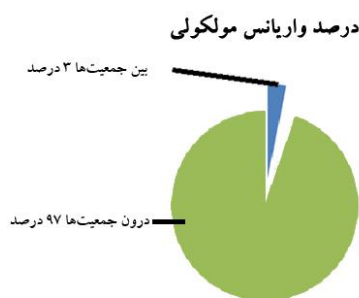
نام آغازگر	توالی (3'→5')	دمای اتصال
7R-OS	F: AGAGGAAATGAGCAGCCTC R: GATGCGCAACAGTTATGTC	۵۸
25-OS	F: TTGTGAAATTGCATTGCACTC R: AACTCCCTTTGATCCTCTGC	۵۴
OS-7	F: TGTCTGCTGCCTCGGCCTG R: ACTGTGCCGCATCGCCAG	۵۳
OS-64	F: CAGTGTCTTCAGTTCCTTGC R: CAGAAGCATCTTATTGATGAC	۵۴

ارزیابی تعداد آلل مشاهده شده و مؤثر (N_e و N_a) در هر جایگاه، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و مورد انتظار (H_e) در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، آزمون انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ، میزان شاخص درون آمیزی (F_{IS}) و سطح معنی‌داری آن، مقادیر فاصله (D) و شباهت ژنتیکی (I) (Nei, 1978) بین جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenAlex6.3 و Arlequin صورت گرفت. نحوه توزیع تنوع مشاهده شده و همچنین، میزان تمایز بین مناطق با استفاده از معیار F_{ST} و تحت آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) نرم‌افزار GenAlex6.3 و Arlequin محاسبه شد (Peakall and Smouse, 2005; Excoffier and Lischer, 2010).

نتایج

در مجموع، ۴ جایگاه در این تحقیق استفاده شد که همگی جایگاه‌ها چندشکل بودند (جدول ۲). دمای اتصال و محدوده بانندی مطابق جدول ۲ برای جایگاه‌های OS7R، OS25، OS7 و OS64 بهینه شد. آلل‌های مشاهده شده در محدوده ۴-۹ آلل (حداقل ۴

واینبرگ، ۶ نمونه از ۸ آزمون بررسی شده (جایگاه \times منطقه) پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی انحراف معنی داری از تعادل نشان دادند ($P < 0.001$). متوسط شاخص درون آمیزی (F_{IS}) و تمایز (F_{ST}) به ترتیب ۰/۲۴ و ۰/۰۱ به دست آمد (جدول ۴). کمترین میزان تمایز مشاهده شده ۰/۰۱۰ در جایگاه OS25 و بیشترین میزان آن ۰/۰۲۲ در جایگاه OS7R به دست آمد (جدول ۴). همچنین، جریان ژنی بالایی (۱۰/۷۶) در سطح جایگاه‌ها مشاهده گردید (جدول ۴). نتایج حاصل از آنالیز نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی (۹۷ درصد) درون هر جمعیت برقرار بوده، اختلاف ژنتیکی پایینی (۳ درصد) بین جمعیت‌ها وجود دارد (شکل ۳). میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بین مناطق نیز به ترتیب ۰/۸۲ و ۰/۱۹ به دست آمد.



شکل ۳- توزیع تنوع واریانس تحت معیار F_{ST} بر اساس آنالیز AMOVA

این ماهی با استفاده از روش ریزماهواره انجام گرفت. این ماهی فاقد آغازگر اختصاصی است و چهار آغازگر استفاده شده در این تحقیق، بر اساس چندشکلی بالایی که در *Oreochromis shiranus* از دیگر جنس‌های سیچلید مشابه با جنس *Iranocichla* دارند، انتخاب شدند. با وجود غیراختصاصی بودن، تمامی آغازگرهای استفاده شده در ماهی سیچلید ایرانی، چندشکل بودند. چندشکلی تمامی آغازگرهای

نمونه‌برداری در چهار جایگاه مورد مطالعه بین ۰/۱۶-۱ (حداقل ۰/۱۶ مربوط به جایگاه OS7R در ناحیه مهران و حداکثر ۱ مربوط به جایگاه OS7 ناحیه چشمه خورگو و مهران و OS64 در ناحیه چشمه خورگو) و متوسط ۰/۷۸ برای نمونه‌های چشمه خورگو و ۰/۶۰ برای نمونه‌های مهران بود (جدول ۳). دامنه H_e نیز در بین نواحی نمونه‌برداری در چهار جایگاه مورد مطالعه بین ۰/۴۸-۰/۸۲- (حداقل ۰/۴۸ مربوط به جایگاه OS7R در ناحیه مهران و حداکثر ۰/۸۲ مربوط به جایگاه OS64 در ناحیه چشمه خورگو) و متوسط ۰/۷۱ برای نمونه‌های چشمه خورگو و ۰/۶۸ برای نمونه‌های مهران بود (جدول ۳). به منظور بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در تمامی نواحی و جایگاه‌های مورد بررسی از آزمون X^2 استفاده شد. در بررسی تعادل هاردی-

جدول ۴- میزان جریان ژنی (N_m)، شاخص درون آمیزی (F_{IS}) و شاخص تمایز (F_{ST}) در سطح چهار جایگاه مطالعه شده

جایگاه	OS64	OS7	OS25	OS7R	میانگین
N_m	۱۹/۳۸	۱۳/۱۹	۲۵/۶۶	۱۰/۹۴	۱۷/۲۹
F_{IS}	۰/۰۵	-۰/۱۰	-۰/۱۲	۰/۷۱	۰/۲۴
F_{ST}	۰/۰۱۳	۰/۰۱۹	۰/۰۱۰	۰/۰۲	۰/۰۱

بحث

مطالعه در مورد تنوع آبزیان و حفاظت از منابع ژنتیکی طی چند دهه گذشته به طور فزاینده‌ای افزایش یافته است. یکی از اهداف اصلی آزمایش‌های ژنتیک مولکولی در آبزیان، آنالیز ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی، ارتباطات گونه‌ای، رده‌بندی و طبقه‌بندی آبزیان است. در این مطالعه، ارزیابی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های سیچلید ایرانی در دو منطقه عمده پراکنش

مارمنور (Mar Menor) اسپانیا با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره، کوچک بودن اندازه جمعیت دلیل کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار اعلام شد (Chen et al., 2009).

در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ، ۵ آزمون از ۸ آزمون بررسی شده (جایگاه × منطقه) پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی انحراف معنی داری از تعادل نشان دادند ($P < 0.001$). با توجه به نتایج حاصل در این تحقیق، می توان اذعان نمود که اغلب جایگاهها انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان می دهند. انحراف از تعادل در این جمعیت ها می تواند در اثر غیر اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده و کوچک بودن اندازه جمعیت ها نیز باشد. در مطالعه ساختار جمعیت دو گونه *H. laparogramma* و *Haplochromis pyrrhocephalus* از سیچلیدهای پلاژیک دریاچه ویکتوریا آفریقا (بین سه کشور تانزانیا، اوگاندا و کنیا) با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره، آلل های نول دلایل اصلی انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ گزارش شد (Maeda et al., 2009).

میزان شاخص درون آمیزی بین دو جمعیت ۰/۰۴۵ به دست آمد. لذا، احتمال وجود افراد خویشاوند در نمونه های مورد استفاده می تواند یکی از دلایل احتمالی پایین بودن هتروزیگوسیتی و انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ باشد. در بررسی دیگر، ارتباط خویشاوندی در ۸۲ قطعه تیلایای چانه سیاه (*Sarotherodon melanotheron*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره، حضور افراد خویشاوند در جمعیت های پرورشی دلیل اصلی کاهش هتروزیگوسیتی در مقایسه با مقدار آن جمعیت های تالابی گزارش شد (Pouyaud et al., 1999).

نتایج آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که ۹۷ درصد

استفاده شده در ماهی سیچلید ایرانی، طی تحقیقاتی درباره تعیین زیرگونه های *O. shiranus* و بررسی تنوع ژنتیکی گله پرورشی *O. shiranus* در مقایسه با گله های وحشی با استفاده از آغازگرهای مشابه اثبات شد (Ambali et al., 1999; 2000). اما در این بررسی، میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و تعداد متوسط آلل در سطح جمعیت ها بالاتر از مقادیر گزارش شده قبلی بود (Ambali et al., 1999; 2000). به نظر می رسد بهره برداری کمتر از ذخایر سیچلید ایرانی از عوامل اصلی بالا بودن تنوع ژنتیکی در جمعیت های سیچلید ایرانی است. نتایج به دست آمده نشان داد که مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه OS7R در دو جمعیت مهران و چشمه خورگو و جایگاه OS64 و OS25 در جمعیت مهران، از مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار کمتر است. غیر اختصاصی بودن آغازگرهای استفاده شده، از مهم ترین عوامل ایجادکننده کسری در جایگاه های ژنی ریزماهوره ای هستند. لذا، با توجه به نتایج به دست آمده، دلیل اصلی کاهش هتروزیگوتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار در این جایگاه ها را می توان ناشی از وجود آلل های نول و یا حضور افراد خویشاوند دانست. کاهش هتروزیگوسیتی در اثر عدم پیروی از تعادل هاردی-واینبرگ و عواملی نظیر کوچک بودن اندازه جمعیت، تنگنای ژنتیکی، جفت گیری غیر تصادفی نیز ایجاد می شود. پیش از این نیز آلل های نول به عنوان دلیل کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار گزارش شده اند (Ambali et al., 2009). با این وجود، در سال ۲۰۰۹، در بررسی تفاوت ژنتیکی و جریان ژنی در گونه *Pomatoschistus marmoratus* در دو نقطه تالاب

ژنتیکی اندک بین دو جمعیت را علی‌رغم مدت زمان طولانی جدایی آنها توجیه کند.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان بیان داشت که به‌طور کلی تنوع ژنتیکی چشمگیری در هر دو جمعیت سیچلید ایرانی در دو ناحیه چشمه خورگو و نیز مهران وجود دارد که بیانگر وضعیت مناسب ذخایر این گونه در دو زیستگاه اصلی در استان هرمزگان است. با این وجود، مقدار تنوع ژنتیکی در جمعیت چشمه خورگو نسبت به جمعیت مهران تا حدودی بیشتر بود که شاید به دلیل تخریب کمتر این زیستگاه نسبت به رودخانه مهران باشد. احتمال جابه‌جایی ماهیان بین دو منطقه مورد مطالعه از طریق آب دریا وجود دارد. پایین بودن فاصله ژنتیکی، جریان ژنی قابل توجه بین دو منطقه و عدم وجود ارتباط بین دو ناحیه از طریق رودخانه در خشکی، همگی می‌تواند احتمال جابه‌جایی از طریق آب دریا را قوت بخشد. این پدیده با توجه به قابلیت بالای این گونه برای تحمل مقادیر بالای شوری آب و فاصله نسبتاً نزدیک دهانه دو رودخانه در دریا می‌تواند به ویژه در موارد سیلابی شدن رودخانه‌ها محتمل باشد، با این وجود، تأیید یا رد قطعی این نظریه نیازمند ارزیابی دقیق بوم‌شناسی و مولکولی سیچلید ایرانی دارد. لذا، پیشنهاد می‌گردد که چنین مطالعاتی در مورد سایر جمعیت‌های این گونه با روش‌های متفاوت مولکولی انجام شود تا درک دقیق‌تری از وضعیت تنوع آنها فراهم شود. افزایش تعداد نمونه‌ها از هر ایستگاه و بررسی تعداد جایگاه‌های بیشتر می‌تواند در ارزیابی دقیق‌تر یاری‌کننده باشد.

تنوع در درون جمعیت‌ها، و تنها ۳ درصد بین جمعیت‌ها وجود دارد، مقدار به دست آمده F_{ST} (۰/۰۲۵) معنی‌دار نبوده، تمایز پایینی را بین جمعیت‌ها نشان داد. بر اساس معیار رایت (Wright, 1951) میزان F_{ST} بین ۰ تا ۰/۰۵ نشان‌دهنده تمایز پایین است. پایین بودن تمایز بین دو جمعیت را می‌توان به‌طور کلی، کم بودن تمایز بین دو جمعیت مطالعه شده، می‌تواند بیانگر منشأ احتمالی یکسان آنها و یا جابه‌جایی قابل توجه افراد بین دو جمعیت مورد بررسی باشد. اگرچه اطلاعات دقیقی در خصوص هیچ یک از این دو پدیده وجود ندارد، اما هر دو حالت محتمل است و برای پاسخ قطعی در این خصوص، لازم است تا مطالعات تکمیلی به همراه بررسی بوم‌شناختی این گونه صورت گیرد. علاوه بر این دلایل زیستی، مواردی همچون تعداد اندک آغازگر مورد استفاده و غیراختصاصی بودن آنها نیز می‌تواند در بروز این پدیده مؤثر باشد، به بیان دیگر، احتمال دارد با افزایش تعداد آغازگرها و نیز تعداد نمونه مورد بررسی، نتایج متفاوتی در نه تنها در خصوص جریان ژنی و تعداد افراد مهاجر بلکه در خصوص سایر شاخص‌های مورد سنجش نیز حاصل شود. با این وجود، در بررسی تفاوت ژنتیکی، اندازه مؤثر جمعیت و جریان ژنی در چند گونه از ماهیان دریایی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، دلیل اصلی پایین بودن تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها، جریان ژنی تشخیص داده شد (Cano et al., 2008). میزان جریان ژنی قابل توجه بین دو ایستگاه عدد ۱۰/۷۶ به دست آمد که شاید بیانگر جابه‌جایی بین دو جمعیت رودخانه‌ایی از طریق دریا باشد که منجر به تفکیک جزئی؟ دو جمعیت از نظر ژنتیکی می‌شود. همان گونه که بیان شد، بروز این پدیده محتمل است لذا، شاید این پدیده بتواند تمایز

منابع

- عبدلی، ا. (۱۳۷۸) ماهیان آب‌های داخلی ایران. موزه طبیعت و حیات وحش ایران، تهران.
- گنجعلی، ز. (۱۳۸۴) مطالعات ریخت‌شناسی و زیست‌شناسی تولیدمثل ماهی کرو (*Iranocichla hormuzensis*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
- Ambali, A. J. D., Doyle, R. W. and Cook, D. I. (1999) Genetic changes in *Oreochromis shiranus* (Trewavas) associated with the early stages of national aquaculture development in Malawi. *Aquaculture Research* 30: 579-588.
- Ambali, A. J. D., Doyle, R. W. and Cook, D. I. (2000) Development of polymorphic microsatellite DNA loci for characterizing *Oreochromis shiranus* subspecies in Malawi. *Journal of Applied Ichthyology* 16: 121-125.
- Appleyard, S. A., Ward, R. D. and Grewe, P. M. (2002) Genetic stock structure of big eye tuna in the Indian Ocean using mitochondrial DNA and microsatellite. *Journal of Fish Biology* 60: 767-770.
- Cadrin, S. X. (2000) Advances in morphometric identification of fishery stocks. *Fish Biology and Fisheries* 10: 91-112.
- Cano, J. M., Shikano, T., Kuparinen, A. and Merila J. (2008) Genetic differentiation, effective population size and gene flow in marine fishes: implications for stock management. *Molecular Ecology* 5: 1-10.
- Chen, C. V., Wanguemert, M. G., Marcos, C. and Ruzafa A. P. (2009) High gene flow promotes the genetic homogeneity of the fish goby *Pomatoschistus marmoratus* (Risso, 1810) from Mar Menor coastal lagoon and adjacent marine waters (Spain). *Marine Ecology* 31: 270-275.
- Esmaili, H. R., Piravar, Z. and Ebrahimi, M. (2006) Karyological analysis of Iranian cichlid fish, *Iranocichla hormuzensis* Coad, 1982, from southern Iran. *Journal of Applied Animal Research* 30:77-79.
- Esmaili, H. R., Ganjali, Z. and Monsefi, M. (2009) Reproductive biology of the endemic Iranian cichlid, *Iranocichla hormuzensis* Coad, 1982 from Mehran River, southern Iran. *Environmental Biology of Fishes* 84:141-145.
- Fevolden, S. E. and Pogson, G. H. (1997) Genetic divergence at the synaptophysin locus among Norwegian Coastal and North-east Arctic population of Atlantic Cod. *Journal of Fish Biology* 51: 895-908.
- Hilborn, R., Quinn, T. P., Schindler, D. E. and Rogers, D. E. (2003) Biocomplexity and fisheries sustainability. *National Academic Science* 100: 6564-6568.
- Maeda, K., Takeda, M., Kamiya, K., Terai, Y., Okada, N. and Tachida, H. (2009) Population structure of two closely related pelagic cichlids in Lake Victoria, *Haplochromis pyrrhocephalus* and *H. laparogramma*. *Genetics* 441: 67-73.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nelson, J. S. (2006) *Fishes of the world*. John Wiley and Sons, New York.
- Peakall, M. and Smouse, A. (2005) *Gene Alex 6: Genetic analysis in Excel*. Population genetic software for teaching and research. The Australian national university, Canberra, Australia.
- Pouyaud, L., Desmarais, E., Chenuil, A., Agnese, J. F. and Bonhomme, F. (1999) Kin cohesiveness and possible inbreeding in the mouth breeding tilapia *Sarotherodon melanotheron* (Pisces Cichlidae). *Molecular Ecology* 8:803-812.
- Wright, S. (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Excoffier, L. and Lischer, H. E. L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.

بررسی تأثیر رقابت اسپرم بر تنوع ژنتیکی نتاج قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

حسین مرادیان^۱، سعید کیوان شکوه^{۱*}، مصطفی محقق دولت آبادی^۲ و عین‌اله گرجی‌پور^۳
^۱ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
^۲ گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران
^۳ مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری، یاسوج، ایران

چکیده

در این پژوهش، با استفاده از اختلافات موجود میان خصوصیات کیفی اسپرم مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان، تأثیر شاخص‌های: تعداد و مدت زمان تحرک اسپرم بر موفقیت رقابت‌پذیری اسپرم بررسی شد. برای اجرای آزمایش تعداد سه قطعه ماهی نر و یک قطعه مولد ماده نیاز بود که این مولدین از میان گله مولدین چهار ساله انتخاب شدند. نسبت لاروهای حاصل از مولدین نر مختلف با استفاده از تجزیه و تحلیل جایگاه‌های ریزماهوره (دو جایگاه) مشخص گردید. لاروهای حاصل از نر شماره ۲ در این آزمایش غالب بودند. میزان مشارکت این مولد در تولید نتاج حاصله بر اساس آنالیز فراوانی آللی دو جایگاه OMM1036 و Ocl8 به ترتیب ۵۶ و ۴۸ درصد بود. انگشت‌نگاری DNA با استفاده از ریزماهوره‌ها نشان داد که مدت زمان تحرک اسپرم عامل تعیین‌کننده‌ای در موفقیت رقابت اسپرم‌ها بود. هیچ‌گونه ارتباطی میان میزان موفقیت لقاح و تعداد نسبی اسپرم و مدت زمان تحرک اسپرم مشاهده نشد. همبستگی بین تراکم اسپرم با میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج منفی و معنی‌دار بود ($r = -0.915$, $n = 30$). نتایج نشان داد که مدت زمان تحرک اسپرم به عنوان عاملی کلیدی در موفقیت رقابت اسپرم در قزل‌آلای رنگین‌کمان مطرح است. در هر دو گروه تیمارهای تک والدی و مختلط، زمانی که میزان مناسب اسپرم به ازای تخمک‌ها (۱۰۷) استفاده شد، درصد موفقیت لقاح بالا ($>95\%$) بود و موفقیت لقاح به استفاده از اسپرم یک یا چند ماهی نر بستگی نداشت ($P > 0.05$).

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، رقابت اسپرم، ریزماهوره‌ها، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، لقاح

مقدمه
با افزایش تقاضای بچه ماهی قزل‌آلا

تکثیر و تولید در کشور طی سال‌های اخیر، تکثیر

می‌کند رقابت اسپرم ایجاد شده در مراکز تکثیر به دلیل اختلاف موجود در شاخص‌های کمی و کیفی اسپرم (شامل تراکم، مدت زمان تحرک، سرعت اسپرم و ...) می‌تواند سبب ایجاد تغییراتی در موفقیت تولید مثلی جنس نر شود و این امر به نوبه خود منجر به افزایش ضریب هم‌خونی و در نتیجه از بین رفتن تنوع ژنتیکی در نتاج تولید شده در مراکز تکثیر می‌شود و دیگر اینکه سبب تحریک انتخاب برخی از صفات خاص در جمعیت می‌گردد. علاوه بر این، هنگام استفاده از اسپرم چندین ماهی نر، به دلیل رقابت ایجاد شده و در نتیجه کاهش سهم افراد در بارورسازی تخمک‌ها، اثرات پدری بر روی مراحل اولیه زندگی تحت‌الشعاع قرار می‌گیرد (Rideout *et al.*, 2004). اعمال تکثیر می‌تواند خطرات بالایی را در رابطه با از دست رفتن تنوع ژنتیکی درون جمعیتی پیش بیاورد. یکی از راه‌های غیرمستقیمی که ممکن است موجب تغییر نسبت‌های جنسی شود، استفاده از اسپرم حاصل از چند ماهی نر است. مخلوط کردن اسپرم چندین ماهی نر می‌تواند به دلیل تفاوت جنبش و خواص اسپرم، موجب نابرابر شدن سهم افراد نر در تأمین نسل آینده شود؛ در نتیجه، به علت آن که تعداد کمتری از افراد نر در مقایسه با تعدادی که واقعاً آمیزش یافته‌اند، سلول‌های جنسی را تأمین می‌کنند و یا به علت آن که تغییر در تعداد فرزندان حاصل از هر ماهی نر (تنوع در اندازه خانواده) افزایش می‌یابد، اندازه مؤثر جمعیت (N_e) کاهش می‌یابد. امروزه، تمایل بسیاری برای به‌کارگیری علم ژنتیک در افزایش کارایی تولید آبنزی‌پروری وجود دارد. طراحی یک برنامه اصلاح نژاد و کاهش اثرات هم‌خونی نیازمند مشخص نمودن والدین است.

غیراصولی پیش‌مولدین به ویژه مولدین نر زودرس باعث ایجاد اختلالات ژنتیکی و هم‌خونی در نسل مولدین و بروز صفات نامطلوب ناشی از آن شده است (علیزاده، ۱۳۸۶).

در حال حاضر، میزان موفقیت لقاح به عنوان یکی از معیارها برای ارزیابی و طبقه‌بندی کیفیت تخم‌قلمداد می‌شود، اما در واقع طبقه‌بندی کیفیت تخم توسط عوامل مختلفی از جمله کیفیت تخمک‌ها پیش از لقاح، تعداد اسپرماتوزآ و سرعت حرکت اسپرم تعیین می‌شود (Kamler, 2005). عمده توجه بخش آبنزی‌پروری بر کیفیت تخمک متمرکز شده است و خصوصیات اسپرم کمتر مد نظر قرار می‌گیرد، در حالی که هر دو این عوامل می‌توانند بر بقا و زنده‌مانی تخم و جنین تأثیرگذار باشند (Snook, 2005؛ Ottesen *et al.*, 2009). امروزه در تفریحگاه‌ها، بسیاری از گونه‌های آزاد ماهیان به منظور حفاظت یا تولید گوشت، مورد تکثیر مصنوعی قرار می‌گیرند. در اغلب موارد در تکثیر مصنوعی از گامت‌ها به صورت لقاح ترکیبی استفاده می‌کنند، به این صورت که تخمک‌های حاصل از چندین ماهی ماده را درون یک ظرف با اسپرم چند ماهی نر ترکیب می‌کنند (Campton, 2004). استفاده از این شیوه لقاح ممکن است سبب افزایش موفقیت لقاح و کاهش حجم کاری برای مدیران مزارع گردد. با این حال، استفاده از ترکیب اسپرم چندین ماهی جهت لقاح منجر به رقابت اسپرم که یکی از نیرومندترین روش‌های به‌گزینی جنسی است، می‌گردد (Birkhead and Møller, 1998؛ Snook, 2005). Campton (۲۰۰۴) دو مشکل اساسی ناشی از استفاده از اسپرم مختلط را شرح داده است که به طور خلاصه بیان

سهم ماهیان در ایجاد نسل جدید در مراکز تکثیر قزل‌آلای رنگین‌کمان نامشخص است. یکی از متغیرهای آمیزشی در شرایط آزمایشگاهی ترکیب جنسی مولدین است. در دهه اخیر، مطالعات متعددی با استفاده از نشانگرهای چندشکلی و به ویژه ریزماهوره‌ها در تعیین والدین ماهیان پرورشی صورت گرفته است (Perez-Herbinger *et al.*, 1995؛ Jackson *et al.*, Enrique and Tanigushi, 1999؛ McDonald *et al.*, Castro *et al.*, 2004؛ 2003؛ 2004؛ Sekino *et al.*, 2004).

از جمله نشانگرهای مولکولی، ریزماهوره‌ها هستند که با داشتن مزایایی چون چندشکلی بالا، طبیعت چند اللی، توارث همباز، طول کوتاه، پراکنش ژنومی وسیع، نسبت و فراوانی بالا، موجب شده که کاربرد موفقیت‌آمیز با تنوع زیاد در رشته‌های مختلف تحقیقاتی و عملی داشته باشند. همچنین، ریزماهوره‌ها در زمینه شیلات و آبی‌پروری برای توصیف ذخایر ژنتیکی، انتخاب ذخایر مولدین، شناسایی ژن‌های کدکننده صفات مهم اقتصادی، برنامه‌های تولید مثلی، مطالعه ساختار جمعیتی، تفکیک نژادهای پرورشی از نژادهای وحشی، ارزیابی رابطه ژنتیکی والدین با فرزندان، مدیریت مولدین، تشخیص ماده‌زایی، پلی‌پلوئیدی، تشخیص دوره‌ها و ارزیابی تکامل، کارآیی بالایی دارند (Castro *et al.*؛ Wilson and Ferguson, 2002؛ Chistiakov *et al.*, 2006؛ *al.*, 2004). هدف از انجام این تحقیق، بررسی تأثیرات رقابت اسپرم بر تنوع ژنتیکی نسل F1 و درک مکانیسم‌های دخیل در رقابت اسپرم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است. در این تحقیق، تأثیر اسپرم مخلوط چندین مولد نر بر میزان

لقاح نیز بررسی شد.

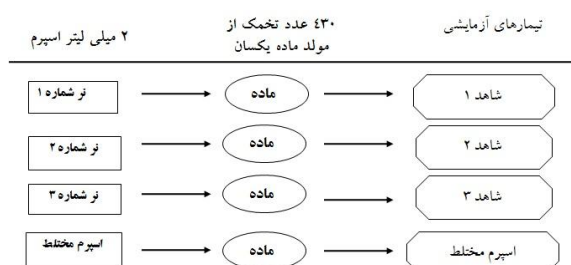
مواد و روش کار

انتخاب مولدین: در این مطالعه، برای اجرای آزمایش تعداد سه قطعه ماهی نر و یک قطعه مولد ماده مورد نیاز بود که این مولدین پس از بررسی، از میان گله مولدین چهار ساله مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج انتخاب شدند. برای انتخاب مولدین معیارهایی از قبیل سلامت ظاهری ماهی و کیفیت گامت‌ها (شامل مدت زمان تحرک و تراکم اسپرم) مد نظر قرار گرفت. به منظور دقت بیشتر در اجرای آزمایش ابتدا حدود دو میلی‌لیتر اسپرم از ۱۰ قطعه مولد گرفته شد و پس از ارزیابی اسپرم آنها سه مولد نر یعنی نرهای شماره ۱، ۲ و ۳ به ترتیب با وزن‌های ۱۵۸۰، ۱۸۴۰ و ۱۷۱۰ گرم انتخاب شدند. همچنین برای تهیه مولد ماده پس از انجام زیست‌سنجی، از بین سه مولد بهترین آنها بر اساس شاخص‌های ظاهری انتخاب شد. سپس مولدین به مخازن فایبرگلاس ۲۲۰ لیتری منتقل شدند.

جمع‌آوری اسپرم و تخمک: اسپرم‌گیری از مولدین در اواخر اسفند ماه سال ۱۳۸۷ در طول فصل تکثیر طبیعی صورت گرفت. مولدین نر پس از معاینه و بیهوشی توسط پودر گل میخک (۱۵۰ ppm) (مهرابی، ۱۳۸۱) ابتدا زیست‌سنجی شده، سپس با ماساژ شکمی به طور جداگانه اقدام به اسپرم‌کشی از آنها گردید. برای ممانعت از بروز هر گونه آلودگی ناحیه شکمی توسط عواملی از قبیل آب، موکوس و ادرار، هر ماهی به دقت توسط حوله خشک شد (Dreanno *et al.*, 1998). پیش از لقاح، تراکم اسپرم از طریق شمارش اسپرم‌ها بر روی لام

آزمایش در نظر گرفته شد.

برای انجام لقاح از حجم یکسان اسپرم (۲ میلی لیتر) استفاده شد. حجم اسپرم مورد نیاز جهت انجام لقاح بر اساس شمارش اسپرم‌های هر ماهی انتخاب شد، به طوری که شرایط به گونه‌ای باشد که نسبت اسپرم به تخم که جهت لقاح موفق ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پیشنهاد شده است به صورت ۱: $10^7 \times 1$ باشد (Scott and Baynes, 1980). برای این منظور در سه تیمار اول، دوم و سوم (شاهد ۱، ۲ و ۳) که به ترتیب مربوط به نرهای شماره ۱، ۲ و ۳ هستند، دو میلی لیتر اسپرم به هر ظرف اضافه شد و برای تیمار چهارم (تیمار ترکیب اسپرم) ابتدا حجم یکسان از اسپرم هر سه مولد نر را در یک ظرف مخلوط کرده (هر مولد ۲ میلی لیتر و در مجموع ۶ میلی لیتر)، با همان حجم دو میلی لیتر اسپرم اضافه گردید (شکل ۱). به منظور اطمینان از قابلیت بارورسازی، موفقیت در میزان تفریح و کیفیت تخمک در سه تیمار اول، اسپرم هر ماهی نر به صورت جداگانه اضافه شد و در تیمار چهارم ترکیب سه اسپرم پس از مخلوط و همگن شدن به همان حجم اضافه شد. لقاح با استفاده از حجم یکسان اسپرم در سه ماهی نر شماره ۱، ۲ و ۳ انجام شد و در تیمار مختلط حجم یکسان مخلوط اسپرم سه ماهی (۲ میلی لیتر) استفاده شد.



شکل ۱- نمای کلی از طراحی آزمایش شامل یک مولد ماده و سه مولد نر

هماسیتومتر تخمین زده شد. به منظور رسیدن اسپرم‌ها به تراکم قابل شمارش، نمونه‌ها در سرم فیزیولوژیک $0/6$ تا $0/7$ درصد با نسبت ۱ به ۱۰۰۰ رقیق‌سازی شد. تعداد متوسط اسپرم‌ها برای هر ماهی با سه شمارش محاسبه گردید. تراکم اسپرم با در نظر گرفتن میزان رقیق‌سازی به صورت تعداد اسپرم‌ها در یک میلی لیتر مایع منی بیان شد (Geffen and Evans, 2000). جهت استخراج DNA، قطعه‌ای از باله دمی هر کدام از مولدین نر برداشته، در اتانول ۹۶ درصد تثبیت شد.

بورسی و ارزیابی کیفیت اسپرم: مدت زمان

تحرك اسپرم زمانی است که پس از فعال‌سازی، ۹۵ درصد اسپرم‌ها حرکت رو به جلو داشته باشند. به منظور ارزیابی تحرك اسپرم، پس از اسپرم‌گیری حدود ۱۰ میکرولیتر از اسپرم بر روی لام قرار داده، سپس، توسط یک فعال‌کننده (آب) فعال شد و مدت زمان تحرك تا زمانی که تمام اسپرم‌ها غیرفعال شوند توسط کورنومتر ثبت گردید. مدت زمان‌هایی که ۹۵ درصد اسپرم‌ها تحرك خود را از دست دادند نیز ثبت گردید (Nagler *et al*, 2000). تمام اندازه‌گیری‌ها به منظور اطمینان از تکرارپذیری و قابل اعتماد بودن داده‌ها سه بار صورت گرفت.

طراحی آزمایش رقابت اسپرم: حدود دو ساعت

پیش از شروع عملیات تکثیر و اجرای آزمایش رقابت اسپرم، به منظور ارزیابی شاخص‌های کیفی اسپرم از سه مولد نر حدود دو میلی لیتر اسپرم گرفته شد. سپس تخم‌گیری از مولد ماده انجام شد، تخمک‌ها توزین شدند و به صورت مساوی در ۱۲ قسمت (چهار تیمار و سه تکرار) در ظروف کوچک تقسیم‌بندی شدند. بدین ترتیب که حدود ۴۳۰ عدد تخم برای هر

تا ۱۸ روز پس از لقاح، در این مرحله درصد چشم‌زدگی تخم‌ها با رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\times 100 = \frac{\text{تعداد تخم‌های چشم‌زده}}{\text{تعداد تخم‌های لقاح یافته}} = \text{درصد چشم‌زدگی}$$

۳۰ تا ۳۳ روز پس از لقاح، لاروهای تفریخ‌شده شمارش گردید. در این مرحله، درصد تفریخ لاروها از رابطه زیر محاسبه گردید (Ottesen *et al.*, 2009):

$$\times 100 = \frac{\text{تعداد لاروهای تفریخ شده}}{\text{تعداد تخم‌های چشم‌زده}} = \text{درصد تفریخ لاروها}$$

بررسی ژنتیکی مولدین و نتاج: نمونه‌برداری از مولدین نر در زمان اسپرم‌گیری صورت پذیرفت. پس از تفریخ نیز، تمامی لاروها به دقت بررسی شدند. سپس تعداد ۱۰ قطعه لارو از هر تکرار به صورت تصادفی برداشته، در اتانول ۹۶ درصد تثبیت گردید. استخراج DNA با استفاده از کیت‌های استخراج DNA محصول شرکت سیناژن (DNA DNPTM) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد ارزیابی شد (McQuown *et al.*, 2000). واکنش PCR برای تمام نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ساخته شده انجام شد و بهترین دمای الحاق برای هر یک از آغازگرها به دست آمد. تجزیه و تحلیل ژنتیک نتاج مربوط به هر تیمار با استفاده از ۶ آغازگر ریزماهوره ویژه آزادماهیان (جدول ۱) انجام شد (Johnson *et al.*, 2007). این آغازگرها بر اساس سایر مطالعات روی آزادماهیان انتخاب شدند. معیارهای که در انتخاب این آغازگرها مد نظر قرار گرفت شامل عدم مضاعف‌سازی (non-duplication) آنها و مشاهده نشدن آلل‌های پوچ هستند.

پس از افزودن اسپرم، به مدت یک دقیقه مخلوط اسپرم و تخمک به هم زده شد تا لقاح صورت پذیرد. سپس مقداری آب چشمه اضافه شد که با هم زدن آنها در مدت ۱ تا ۲ دقیقه عمل لقاح انجام می‌گیرد. در ادامه، به مدت ۵ دقیقه تخم‌ها در همین حالت نگه داشته شد و پس از این مدت زمان تخم‌ها به تدریج شسته شدند تا اسپرم اضافی خارج و آب حاوی تخم‌ها کاملاً شفاف گردد. در مرحله بعد، به منظور جذب آب توسط تخم‌ها مقداری از آب چشمه تأمین‌کننده آب سالن انکوباسیون را اضافه کرده، اجازه داده شد تا حدود ۴۵ دقیقه فرآیند جذب آب طول بکشد (Nilsson and Cloud, 1992).

مرحله انکوباسیون و تولید لارو: پس از انجام عملیات لقاح، تخم‌های لقاح یافته به سالن انکوباسیون، که آب آن توسط چشمه با دمای $10/8 \pm 0/5$ درجه سانتیگراد تأمین می‌شد منتقل شد. تخم‌ها و لاروها مراحل انکوباسیون را در شرایط تاریکی طی کردند و در بررسی‌های روزانه میزان تلفات جمع‌آوری و ثبت شد. برای نمونه‌برداری، لاروها تا زمان شروع تغذیه فعال که حدود ۵۰ روز طول کشید، نگهداری شدند. ۸ روز پس از لقاح تعداد ۳۰ عدد تخم از هر واحد آزمایشگاهی برداشته، در یک پتری‌دیش حاوی محلول استیک اسید، متانول و آب مقطر (با نسبت ۱:۱:۱) قرار داده، پس از ۵ دقیقه تخم‌های لقاح یافته به راحتی از طریق حضور یک کمربند عصبی واضح از تخم‌های لقاح نیافته مشخص شدند (Springate *et al.*, 1984; Ottesen *et al.*, 2009; Geffen and Evans, 2000).

$$\times 100 = \frac{\text{تعداد تخم‌های لقاح یافته}}{\text{تعداد کل تخمک‌ها}} = \text{درصد لقاح}$$

پس از آن با ۳۰ چرخه ۳۰ ثانیه‌ای در ۹۴ درجه، ۵۰ ثانیه در دمای اتصال مربوط (جدول ۱) و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد ادامه یافت. برنامه فوق با درجه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بسط و خاتمه یافت. الکتروفورز محصول PCR، با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶ درصد صورت گرفت و از رنگ آمیزی نترات نقره برای ظاهرسازی باندها روی ژل پلی‌اکریل‌آمید استفاده شد (Pourkazemi, 1996).

برای انجام PCR با توجه به تعداد تیوب‌ها یک مخلوط PCR برای همه آنها تهیه گردید. در هر واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر از حدود ۵۰ نانوگرم DNA، ۱X بافر PCR، ۲۰۰ میکرومولار از هر dNTP، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۷ واحد آنزیم تگ‌پلیمراز و ۱/۷۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم استفاده شد. برنامه حرارتی PCR نیز به صورت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه جهت واسرشت‌سازی اولیه تنظیم شد و

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای استفاده شده برای بررسی ژنتیکی مولدین و نتاج

نام جایگاه ژنی	واحد تکرار شونده	توالی آغازگرهای رفت (forward) و برگشت (reverse)	دمای اتصال (°C)
OMM1036	TATC	F-TGTAGCAGGTGAGAATACCCA R-CACCATCTCCATCCTAGGC	۶۰
Ssa85	GT	F-AGGTGGGTCTCCAAGCTAC R-ACCCGCTCCTCACTTAATC	۵۵
Ocl8	GT	F-TAGTGTTCCGTGTTTCGCCTG R-CACCTCCATCTCTCATTCCAC	۵۷
OMM1307	CTAT	F-GCACAACACTACGAAACCCAA R-TGCCAGCTCTGCTATGACATT	۵۲
OMM1315	CATC	F-TACAGGGCTTGGCTCTATCTC R-GCCAAATACTTTCGCAAGG	۶۱
Ssa197	GTGA	F-GGGTTGAGTAGGGAGGCTTG R-TGGCAGGGATTTGACATAAC	۶۰

از آزمون توکی برای بررسی معنی‌دار بودن اختلاف میانگین‌ها و سطح معنی‌داری استفاده شد. سنجش تأثیر شاخص‌های اسپرم‌شناختی بر روی میزان لقاح، درصد چشم‌زدگی، تفریح و بازماندگی لارو از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد. رسم نمودارها در برنامه Excel انجام شد. در نهایت، از ضریب همبستگی پیرسون برای درک ارتباط خطی بین شاخص‌های کیفی اسپرم و میزان مشارکت مولدین استفاده شد.

نتایج

ارزیابی شاخص‌های کیفی اسپرم مولدین:
بیشترین مدت زمان تحرک اسپرم مربوط به اسپرم ماهی

تجزیه داده‌ها

پس از تعیین ژنوتیپ‌های تمامی افراد، داده‌ها وارد نرم‌افزار GENALEX 6 (www.anu.edu.au) شد و شاخص‌هایی نظیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_0) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) محاسبه شدند. پیش‌بینی و همچنین ردیابی هر کدام از لاروها، با نرم‌افزار FAP (Family Analysis Program) بر اساس روش حذفی صورت گرفت (Ottesen *et al.*, 2009). اطلاعات جمع‌آوری شده با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶/۰ بررسی شد. تأیید نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولوموگروف-اسمیرنوف انجام و وجود اختلاف آماری با آنالیز واریانس (ANOVA) مشخص گردید.

مرحله چشم زدگی رسیدند و تخم گشایی آنها در روز سی و دوم کامل شده و شروع تغذیه فعال آنها در روز پنجاهم بود (جدول ۳).

نتایج PCR: پس از تغییر شرایط PCR بهترین شرایط به دست آمده از نظر غلظت مواد و شرایط برنامه دمایی به نحوی که حداقل باند اضافی را دارا باشد و باندهای اصلی دارای وضوح کامل باشند طبق شرایط جدول ۴ به دست آمد. از بین ۶ آغازگر استفاده شده آغازگرهای OMM1036 و Ocl8 تولید باندهای چندشکل نمودند، آغازگرهای Ssa85 و OMM1307 باند DNA ایجاد کردند ولی به صورت تک شکل بودند و در بررسی‌ها استفاده نشدند. آغازگرهای به کار گرفته شده OMM1315 و Ssa197 در این بررسی بانندی ایجاد نمودند.

نر شماره ۲ با مدت زمان ۵۳/۶۰ ثانیه بود. مدت زمان تحرک اسپرم برای ماهیان نر شماره ۳، ۱ و مخلوط اسپرم به ترتیب ۴۳/۹۰ و ۴۳/۴۶ و ۳۹/۴۳ ثانیه بود (جدول ۲). مدت زمان تحرک اسپرم در مولد نر شماره ۲ به طور معنی داری بیشتر از سایر مولدین نر بود ($P < 0.05$), در حالی که اختلاف معنی داری در مدت زمان تحرک سایر تیمارها مشاهده نشد ($P \geq 0.05$). بیشترین تراکم اسپرم ($10.9 \times 1/11 \pm 15/91$) مربوط به ماهی نر شماره ۳ بود که بیشتر از بقیه تیمارها بود و این اختلاف از نظر آماری با نرهای شماره ۱ و ۲ معنی دار بود ($P < 0.05$), ولی با تیمار مخلوط اسپرم اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P \geq 0.05$).

درصد لقاح، چشم زدگی و میزان تفریح: جنین‌ها

در روز نهم به مرحله اندام‌زایی و در هجدهمین روز به

جدول ۲- میانگین ویژگی‌های زیست‌سنجی و کیفی اسپرم مولدین نر. وجود حداقل یک حرف مشترک در هر ردیف بیانگر عدم اختلاف معنی دار است و حروف غیر مشترک بیانگر اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) است.

تیمار	وزن بدن (گرم)	طول کل (سانتی‌متر)	حجم اسپرم (میلی‌لیتر)	مدت زمان تحرک (ثانیه)	تراکم اسپرم 10^9 Cell/ml
نر شماره ۱	۱۵۸۰	۴۵	۱۲	۴۳/۴۶ ± ۰/۹۹ ^a	۱۳/۲۰ ± ۱/۱۲ ^a
نر شماره ۲	۱۸۴۰	۴۷	۱۳	۵۳/۶۰ ± ۴/۹۳ ^b	۱۱/۹۱ ± ۰/۵۵ ^a
نر شماره ۳	۱۷۱۰	۴۵	۱۲	۴۳/۹۰ ± ۲/۰۴ ^a	۱۵/۹۱ ± ۱/۱۱ ^b
اسپرم مختلط	-	-	-	۳۹/۴۳ ± ۲/۴۲ ^a	۱۳/۸۰ ± ۰/۳۶ ^{ab}

جدول ۳- درصد لقاح، چشم زدگی و تفریح در تیمارهای تک والدی و مختلط. وجود حداقل یک حرف مشترک در هر ردیف بیانگر عدم اختلاف معنی دار و حروف غیر مشترک بیانگر اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) است.

تیمار	لقاح (درصد ± انحراف معیار)	چشم زدگی (درصد ± انحراف معیار)	تفریح (درصد ± انحراف معیار)
نر شماره ۱	۹۶/۶۶ ± ۳/۳۳ ^a	۹۵/۵۰ ± ۰/۷۹ ^a	۹۶/۴۱ ± ۰/۹۹ ^a
نر شماره ۲	۹۸/۸۹ ± ۱/۹۳ ^a	۹۵/۹۳ ± ۱/۹۲ ^a	۹۶/۳۲ ± ۱/۹۹ ^a
نر شماره ۳	۹۵/۵۵ ± ۱/۹۲ ^a	۹۴/۷۸ ± ۱/۸۴ ^a	۸۸/۲۱ ± ۳/۳۳ ^b
اسپرم مختلط	۹۹/۳۳ ± ۱/۱۵ ^a	۹۶/۸۷ ± ۰/۳۹ ^a	۹۴/۴۵ ± ۱/۶۲ ^a

متغیر بود. جایگاه‌های ژنی چندشکل OMM1036 و OC18 تنوع ژنتیکی و قدرت ردیابی مناسبی را در مجموع مولدین نر نشان دادند و به منظور محاسبه شاخص‌های تنوع ژنتیکی در لاروها و ردیابی والدین و فرزندان در تیمارهای مختلف استفاده شدند. نتایج تخمین آلل‌های صفر در هر دو جایگاه ژنی منفی بود (جدول ۶).

جدول ۶- تخمین شاخص‌های تنوع ژنتیکی در دو جایگاه مختلف چندشکل در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. N.A: تعداد آلل‌ها، Ho: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، He: هتروزیگوسیتی مورد انتظار، PIC: محتوای اطلاعات چندشکلی، Excl1: قدرت هر جایگاه ژنی برای ردیابی والدین و فرزندان هنگامی که اطلاعات ژنتیکی یکی از والدین موجود نباشد، Excl2: قدرت هر جایگاه ژنی برای ردیابی والدین و فرزندان هنگامی که اطلاعات ژنتیکی هر دو والد موجود باشد. Nu: فراوانی آلل‌های صفر.

جایگاه ژنی	N.A	Ho	He	PIC	Excl1	Excl2	Nu
OMM1036	۶	۰/۹۵۶	۰/۸۷۲	۰/۸۲۶	۰/۶۶۸	۰/۷۸۷	۰/۰۴۵
OC18	۴	۰/۹۱۴	۰/۸۵۸	۰/۷۳۲	۰/۵۳۶	۰/۶۴۸	۰/۰۶۵

برای مقایسه شاخص‌های تنوع ژنتیکی مولدین نر و لاروهای قزل‌آلای رنگین کمان، تعداد آلل‌ها، هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و محتوای اطلاعات چندشکلی در تیمارهای مختلف آورده شده است (جدول ۷). در تیمار اول تعداد آلل‌ها بین مولدین و لاروها در هر دو جایگاه ژنی چندشکل OMM1036 و OC18 یکسان بود. هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و محتوای اطلاعات چندشکلی در هر دو جایگاه ژنی چندشکل ریزماهواره در لاروها نسبت به مولدین نر کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). در تیمار دوم تعداد آلل‌ها بین مولدین نر و لاروها در جایگاه ژنی OMM1036 یکسان و در جایگاه ژنی OC18 در لاروها کمتر بود.

جدول ۴- نتایج PCR حاصل از آغازگرهای استفاده شده در

آنالیز ریزماهواره قزل‌آلای رنگین کمان

جایگاه ژن	اندازه آلل	تعداد آلل
OMM1036	۲۲۵-۳۲۱	۱۴
Ssa85	۹۶-۱۶۴	مونومورف
Ocl8	۱۰۳-۱۵۳	۱۲
OMM1307	۱۸۶-۲۰۶	مونومورف
OMM1315	عدم تولید باند	-
Ssa197	عدم تولید باند	-

شاخص‌های تنوع ژنتیکی و قدرت ردیابی جایگاه‌های ژنی: فراوانی آللی جایگاه‌های مطالعه

شده در جدول ۵ آمده است. در جایگاه ژنی OMM1036 بیشترین فراوانی آللی ۰/۲۹۷۹ مربوط به آلل F و کمترین فراوانی ۰/۰۹۴۶ مربوط به آلل D است. در جایگاه ژنی Ocl8 بیشترین فراوانی آللی ۰/۲۹۱۱ مربوط به آلل D و کمترین فراوانی ۰/۱۲۴۶ مربوط به آلل A است.

جدول ۵- اندازه و فراوانی آللی در دو جایگاه مختلف چندشکل در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

جایگاه	Ocl8		OMM1036	
	اندازه آللی (جفت باز)	فراوانی آللی	اندازه آللی (جفت باز)	فراوانی آللی
A	۱۵۲	۰/۱۲۴۶	۳۲۷	۰/۱۴۱۷
B	۱۴۷	۰/۱۹۹	۲۲۱	۰/۱۹۷۵
C	۱۱۲	۰/۳۸۵۳	۱۷۶	۰/۰۹۶۴
D	۸۵	۰/۲۹۱۱	۱۳۵	۰/۰۹۴۶
E	-	-	۳۱۶	۰/۱۷۱۹
F	-	-	۱۷۲	۰/۲۹۷۹

نتایج بررسی و تحلیل تنوع ژنتیکی مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین با استفاده از جایگاه‌های ژنی ریزماهواره نشان داد که تعداد آلل‌ها در مولدین نر ۶ و ۴ آلل به ترتیب برای جایگاه‌های چندشکل OMM1036 و OC18 و سه آلل برای جایگاه تک‌شکل

چندشکل ریزماهواره در لاروها نسبت به مولدین نر کاهش معنی داری داشت ($P < 0/05$). در تیمار چهارم تعداد آلل‌ها بین مولدین و لاروها در هر دو جایگاه ژنی چندشکل OMM1036 و OCI8 یکسان بود. هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و محتوای اطلاعات چندشکلی در هر دو جایگاه ژنی چندشکل ریزماهواره در لاروها نسبت به مولدین کاهش معنی داری داشت ($P < 0/05$).

هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و محتوای اطلاعات چندشکلی در هر دو جایگاه ژنی چندشکل ریزماهواره در لاروها نسبت به مولدین نر کاهش معنی داری داشت ($P < 0/05$). در تیمار سوم تعداد آلل‌ها بین مولدین نر و لاروها در هر دو جایگاه ژنی چندشکل OMM1036 و OCI8 یکسان بود. هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و محتوای اطلاعات چندشکلی در هر دو جایگاه ژنی

جدول ۷- مقایسه شاخص‌های تنوع ژنتیکی در دو جایگاه مختلف چندشکل در ماهی قزل آلالی رنگین کمان

شاخص	جایگاه ژنی تیمار	OMM1036		OCI8		میانگین
		مولدین نر	لاروها	مولدین نر	لاروها	
N.A. (تعداد آلل‌ها)	تیمار اول	۶	۶	۴	۴	۵
	تیمار دوم	۵	۵	۴	۳	۱۰
	تیمار سوم	۵	۴	۳	۳	۳/۵
	تیمار چهارم	۶	۶	۴	۴	۵
He (هتروزیگوسیتی مشاهده شده)	تیمار اول	۰/۸۸۷	۰/۷۸۷	۰/۸۴۸	۰/۷۲۲	۰/۷۵۴ ± ۰/۰۱۱
	تیمار دوم	۰/۹۱۲	۰/۸۲۳	۰/۸۵۶	۰/۶۸۹	۰/۷۵۶ ± ۰/۰۰۷
	تیمار سوم	۰/۹۴۵	۰/۸۳۵	۰/۸۶۸	۰/۷۳۶	۰/۷۷۳ ± ۰/۰۰۹
	تیمار چهارم	۰/۹۳۶	۰/۸۵۲	۰/۷۹۹	۰/۷۲۲	۰/۷۸۱ ± ۰/۰۰۷
Ho (هتروزیگوسیتی مورد انتظار)	تیمار اول	۰/۹۸۳	۰/۸۵۴	۰/۸۶۸	۰/۶۸۸	۰/۷۸۱ ± ۰/۰۰۵
	تیمار دوم	۰/۹۷۸	۰/۹۲۱	۰/۸۶۷	۰/۷۰۳	۰/۸۱۲ ± ۰/۰۰۲
	تیمار سوم	۱	۰/۹۳۴	۰/۹۱۹	۰/۷۵۹	۰/۸۶۰ ± ۰/۰۱۹
	تیمار چهارم	۰/۹۹۲	۰/۸۹۹	۰/۸۴۵	۰/۶۸۲	۰/۷۹۰ ± ۰/۰۱۰
PIC (محتوای اطلاعات چندشکلی)	تیمار اول	۰/۸۴۸	۰/۷۶۹	۰/۷۲۴	۰/۶۵۵	۰/۷۱۲ ± ۰/۰۰۹
	تیمار دوم	۰/۸۳۳	۰/۷۹۹	۰/۷۸۴	۰/۶۵۶	۰/۷۲۸ ± ۰/۰۰۷
	تیمار سوم	۰/۸۳۷	۰/۸۰۱	۰/۷۴۵	۰/۶۰۹	۰/۷۰۵ ± ۰/۰۰۸
	تیمار چهارم	۰/۸۴۹	۰/۸۰۹	۰/۷۷۴	۰/۷۴۵	۰/۷۶۷ ± ۰/۰۱۱

اساس فروانی آللی ۵۶ درصد از شناسایی نتاج حاصل از لقاح مولدین نر و ماده با خصوصیات اسپرم‌شناختی مختلف مربوط به والد نر شماره ۲ بود که سهم نتاج حاصل از لقاح اسپرم مولدین نر شماره ۱ و نر شماره ۳

میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج: نتایج بررسی در جایگاه‌های چندشکل در گروه اول لاروهای حاصل از ترکیب اسپرم ماهی قزل آلالی رنگین کمان نشان داد که در جایگاه چندشکل OMM1036 بر

در تولید نتاج بود ($P < 0.01$, $t = 0.857$, $n = 30$). همبستگی بین تراکم اسپرم با میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج نیز منفی و معنی‌دار بود ($n = 30$, $P < 0.01$, $t = -0.915$).

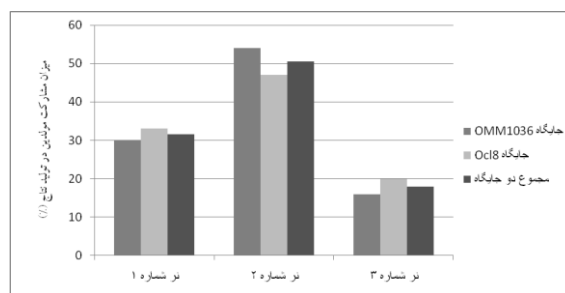
نتیجه‌گیری و بحث

در اغلب مطالعات انجام شده در خصوص مدت زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان، مقادیر متغیری به دست آمده است که صحت این نتایج به تجربه و روش کار بستگی دارد. با بررسی این نتایج می‌توان به این نتیجه رسید که مدت زمان تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلا مطابق با خانواده آزادماهیان است، به طوری که این میزان بین ۱۲/۸ ثانیه تا ۹۹ ثانیه برآورد شده است (Buyukhatipoglu and Holtz, 1984; Geffen and Evans, 2000). نتایج پژوهش حاضر نیز مدت زمان تحرک در همین محدوده بوده است (۳۹/۴۳ تا ۵۳/۶۰). کاهش مدت زمان تحرک در تیمار اسپرم مختلط شاید به دلایلی از جمله برهم‌کنش‌های بیوشیمیایی میان اسپرم‌ها و یا برهم خوردن تعادل یونی مایع سمینال باشد.

تراکم اسپرم نیز از $0.55 \pm 11/91$ میلیارد در میلی‌لیتر اسپرم در نر شماره ۲ تا $1.11 \pm 15/91$ میلیارد در نر شماره ۳ متغیر بوده است. اختلاف در برآورد تراکم اسپرم در مطالعات مختلف می‌تواند به دلایل متفاوتی از جمله نوع پیست کردن (Tvedt et al., 2001)، نوع روش و دستگاه استفاده شده برای ارزیابی باشد. همچنین، تراکم در بین گونه‌های هم‌نوع و در طول فصل تولید مثل متغیر است (Rurangwa et al., 2004). الزاماً اسپرم‌هایی که دارای تراکم بالا هستند بیشترین تحرک و یا بالاترین میزان بارورسازی را

با مولد ماده به ترتیب ۳۰ و ۱۴ درصد بوده است. همچنین، در مورد جایگاه چندشکل Ocl8 سهم والد نر شماره ۲، ۴۸ درصد بود و سهم نتاج با مولدین نر شماره ۱ و شماره ۳ با مولد ماده به ترتیب ۳۲ و ۲۰ درصد به دست آمد.

در گروه دوم لاروهای حاصل از ترکیب اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز نتایج بررسی در جایگاه‌های چندشکل نشان داد که در جایگاه چندشکل OMM1036 بر اساس فراوانی آللی، ۵۴ درصد از شناسایی نتاج حاصل از لقاح مولدین نر و ماده با خصوصیات اسپرم‌شناختی مختلف مربوط به والد نر شماره ۲ بود که سهم نتاج حاصل از لقاح اسپرم مولدین نر شماره ۱ و نر شماره ۳ با مولد ماده به ترتیب ۲۶ و ۲۰ درصد بوده است. همچنین، در مورد جایگاه چندشکل Ocl8 سهم والد نر شماره دو، ۴۹ درصد بود و سهم نتاج با مولدین نر شماره ۱ و شماره ۳ با مولد ماده به ترتیب ۳۲ و ۱۹ درصد به دست آمد (جدول ۷ و شکل ۲).



شکل ۲- میزان مشارکت مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان در تولید لاروها (درصد) در تیمار لقاح اسپرم مختلط (تیمار چهارم)

همبستگی شاخص‌های کیفی اسپرم با میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج: همبستگی شاخص‌های کیفی اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر در تولید نتاج، نشان‌دهنده همبستگی مثبت و معنی‌دار بین مدت زمان تحرک اسپرم با میزان مشارکت مولدین

موفقیت تولید مثلی مولدین نر در شرایط رقابت اسپرم با مدت زمان تحرک اسپرم در ارتباط بود (Tuest *et al.*, 2008). در ماهی هالیبوت اقیانوس اطلس (*Hippoglossus hippoglossus*) نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری بین تحرک اسپرم و موفقیت تولید مثلی مولدین نر مشاهده گردید (Tvedt *et al.*, 2001). سوری‌نژاد (۱۳۸۹) نیز در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) رابطه مثبت و معنی‌داری را بین مدت زمان تحرک اسپرم و تعداد نتاج تولید شده توسط مولدین نر نشان داده است. در مطالعه‌ای دیگر که توسط Birkhead و همکارانش در سال ۱۹۹۹ صورت گرفت، تحرک اسپرم به عنوان عاملی مهم در موفقیت رقابت بارورسازی شناخته شده است. در نقطه مقابل، تولید لارو در روغن ماهی *Gadus morhua* (Trippel and Neilson, 1992) و در ماهی Walleye (*Sander vitreus*) از خانواده سوف ماهیان (Casselmann *et al.*, 2006) با میزان تحرک اسپرم همبستگی معنی‌داری نداشته است.

در تحقیق حاضر، استفاده از نشانگرهای ریزماهواره با میزان مناسبی از قدرت ردیابی والدین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان همراه بود. والدین لاروهایی که به شیوه لقاح اسپرم مختلط تولید شده بودند، با به‌کارگیری تکنیک ردیابی والدین در نرم‌افزار FAP و با استفاده از دو جایگاه ریزماهواره مشخص گردیدند. در تیمار اول ۹۴/۸، در تیمار دوم ۹۴/۳، در تیمار سوم ۹۶/۸ و در تیمار چهارم ۹۷/۷ درصد از لاروها به مولدین نر و ماده تشکیل‌دهنده ردیابی شدند. در میان گزارش‌های منتشر شده در زمینه استفاده از جایگاه‌های ژنی ریزماهواره برای

نخواهند داشت (Geffen and Evans, 2000; Williot *et al.*, 2000). بنابراین، تراکم اسپرم را نمی‌توان به عنوان یک مقیاس ویژه و حساس قدرت بارورسازی اسپرم محسوب کرد و ممکن است در درون یک گونه مشخص ماهی نیز دارای اختلافات چشمگیر باشد. با این حال، زمانی که تخم‌ها با یک حجم ثابت منی لقاح داده می‌شوند و هدف، آنالیز قدرت بارورسازی نمونه‌های مختلف منی باشد (مانند مطالعه حاضر) تراکم اسپرماتوزا به عنوان یک ویژگی مهم مطرح است (Rurangwa *et al.*, 2004).

در این پژوهش، ضریب همبستگی پیرسون، میان عوامل کیفی اسپرم ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با میزان مشارکت مولدین نر در تولید نتاج، نشان‌دهنده همبستگی مثبت میان مدت زمان تحرک اسپرم با میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج بود ($r=0.857$, $n=30$, $P<0.01$). همچنین، مولدین نری که دارای مدت زمان تحرک بیشتری هستند، در مقایسه با اسپرم مختلط و سایر نرها، دارای قدرت لقاح بیشتری بودند. اگر چه این اختلاف مشاهده شده در میزان لقاح از نظر آماری معنی‌دار نبود ولی نتاج حاصل از ردیابی نتاج در تیمار اسپرم مختلط (با استفاده از دو آغازگر چندشکل OMM1036 و Ocl8 به ترتیب ۵۶ و ۴۸ درصد لاروها مربوط به نر شماره ۲ بودند) این مسأله را تأیید نمود که بیشتر نتاج، حاصل از لقاح مولد نر شماره ۲ با تخمک‌های مورد استفاده هستند. مروری بر مطالعات انجام شده در زمینه بررسی همبستگی مدت زمان تحرک اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر در تولید نتاج، نشان‌دهنده برخی تناقضات در نتایج به دست آمده در گونه‌های مختلف است. در قزل‌آلای رنگین‌کمان

مؤثر در رسیدن به درصد بالای ردیابی در تیمارها بود. از عوامل مهم دیگر در رسیدن به درصد قدرت ردیابی بالا در بررسی حاضر، می‌توان به وجود آلل‌های منحصر به فرد در دو جایگاه ژنی چندشکل استفاده شده اشاره نمود.

Hara و Sekino (۲۰۰۳) در گونه فلاندر ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) و Ribeiro و همکاران (۲۰۰۸) در ماهی آزاد اقیانوس اطلس به وجود آلل‌های منحصر به فرد در ژنوتیپ مولدین و عدم وجود آلل‌های خاموش در جایگاه‌های ژنی ریزماهواره مورد استفاده در تعیین ژنوتیپ مولدین به عنوان عوامل مهم در موفقیت آنالیز ردیابی مولدین و فرزندان اشاره کردند.

در این بررسی، تراکم اسپرم نر شماره ۳ به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) بیش از سایر تیمارها بود، با این حال، این نر سهم کمتری در تولید نتاج داشت. نتایج همبستگی بین تراکم اسپرم با میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج نیز منفی و معنی‌دار بود ($n=30$ ، $r=-0/915$ ، $P < 0/01$)، که مؤید عدم وجود ارتباط بین تعداد اسپرم و میزان مشارکت در تولید نتاج است. همبستگی منفی و معنی‌دار یعنی اینکه با افزایش تعداد اسپرم‌ها مشارکت کاهش یافته است. Gage و همکاران (۲۰۰۴) اظهار داشتند که احتمال تماس تخمک با اسپرم تحت تأثیر عواملی از جمله تعداد، سرعت و مدت زمان ماندگاری اسپرم است که ماهیان بر اساس اهمیت این شاخص‌ها خود را با شرایط متغیر وفق داده، به رقابت می‌پردازند. همچنین، Stoltz و Neff (۲۰۰۶) بیان کرده‌اند که اختلاف در تأثیر تعداد اسپرم بر روی موفقیت لقاح ممکن است به شرایط بوم‌شناختی گونه‌ها مرتبط باشد. برای مثال، ماهی آزاد بیشتر در آب‌های

ردیابی والدین و فرزندان، Perez-Enrique و Tanigushi در سال ۱۹۹۹ والدین بیش از ۷۳ درصد از لاروهای تشکیل شده در لقاح مخلوط ماهی باس دریایی قرمز (*Pagrus major*) را با استفاده از چهار الی پنج جایگاه ژنی ریزماهواره تعیین نمودند.

Hara و Sekino (۲۰۰۳) میزان ۸۶ درصد از موفقیت را برای ردیابی والدین در لقاح مخلوط دوازده مولد ماده و شش مولد نر کفشک ماهی ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) با استفاده از چهار جایگاه ژنی ریزماهواره گزارش کردند. در ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*) میزان موفقیت در ردیابی مولدین از ۴۰/۵ تا ۸۰/۹ درصد با استفاده از هشت جایگاه ژنی ریزماهواره در ۲۵ تا ۳۴ مولد مورد استفاده متغیر بود (Borrell et al., 2004). Vandeputte و همکاران (۲۰۰۴) موفقیت ردیابی ۹۵/۳ درصد را در ماهی کپور معمولی با استفاده از هشت جایگاه ژنی ریزماهواره گزارش کردند. در سال ۲۰۰۷ نیز Kim و همکاران انتساب ۸۴/۴ تا ۱۰۰ درصد از لاروهای تولید شده از لقاح مخلوط ماهی کفشک قهوه‌ای (*Pleuronectes herzensteini*) را به والدین تشکیل‌دهنده با استفاده از پنج جایگاه ژنی ریزماهواره انجام دادند. استفاده از نشانگرهای ریزماهواره دارای بیشترین تنوع ژنتیکی و بیشترین قدرت ردیابی والدین در قزل‌آلای رنگین‌کمان، بر اساس آنالیز اولیه نشانگرهای ریزماهواره استفاده شده در آزاد ماهیان صورت پذیرفت. این موضوع نقش زیادی در موفقیت بالای این تکنیک در گونه مورد مطالعه داشت. عدم وجود آلل‌های خاموش در جایگاه‌های ژنی ریزماهواره استفاده شده در مولدین و لاروها نیز از جمله دلایل

اسپرم در عملیات لقاح است و هیچ‌گونه رابطه معنی‌داری میان موفقیت بارورسازی با تعداد نسبی و طول کل اسپرم دیده نشد. سرعت خطی اسپرم دارای ارتباط مثبت و حرکت خطی اسپرم دارای ارتباط معکوس با موفقیت بارورسازی است. Aas و همکاران (۱۹۹۱) گزارش دادند که در ماهی آزاد اقیانوس اطلس با افزایش تراکم اسپرم، میزان لقاح نیز افزایش می‌یابد ولی در این مطالعه، میزان مشارکت والدین در ایجاد نتاج، بررسی نشده بود. در تحقیق حاضر، تراکم اسپرم تعیین‌کننده میزان موفقیت مولدین نر در تولید نتاج نبوده است. این نتیجه در تناقض با تئوری رقابت (Parker, 1990; Ball and Parker, 1998) و گزارش Neff و همکاران (۲۰۰۳) در خورشید ماهی آبشش آبی (*Lepomis macrochirus*) و همچنین، گزارش Snook (۲۰۰۵) در خصوص عدم تأثیر تعداد اسپرم بر رقابت اسپرم است. در تطابق با نتایج مطالعه حاضر، در ماهی آزاد اقیانوس اطلس (Gage et al., 2004) نیز، تعداد اسپرم عامل مشخص‌کننده موفقیت مولدین نر در ایجاد نتاج نبوده است. در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز تراکم اسپرم رابطه منفی با میزان مشارکت مولدین نر در لقاح تخمک‌ها داشته است (Tuest et al., 2008). تعداد اسپرم زمانی در موفقیت بارورسازی مهم است که رقابت اسپرم از یک فرآیند بخت‌آزمایی پیروی کند. در بخت‌آزمایی، قدرت بارورسازی هر ماهی نر در ارتباط با تعداد اسپرم‌هایی است که در رقابت شرکت دارند (Parker, 1990). برای مثال، در ماهی آبشش آبی (*Lepomis macrochirus*)، آزمون‌های لقاح در شرایط آزمایشگاهی که در آن رقابت میان جفت‌نرها مورد بررسی قرار داده شدند، نشان داد که با

جاری تخم‌ریزی می‌کند در حالی که ماهی آبشش آبی در آب‌های ساکن دریاچه‌ها تخم‌ریزی می‌کند. بنابراین، شاید در آب‌های جاری اسپرم‌های سریع‌تر و در آب‌های ساکن تعداد اسپرم‌ها در رقابت دارای اهمیت باشد. Butts و همکاران (۲۰۰۹) نیز معتقدند که تعداد اسپرم مورد نیاز برای لقاح موفق ماهیان استخوانی متفاوت و وابسته به گونه است و به دلایلی از جمله سیستم تخم‌ریزی و لقاح، رفتارهای تخم‌ریزی و ویژگی‌های گامت‌ها برای نفوذ به میکروپیل اشاره کرده‌اند. لذا، نتایج به دست آمده از میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج، نشان‌دهنده این مطلب است که نر شماره ۳ در مقایسه با دیگر ماهیان مولد نر از قابلیت رقابت و بارورکنندگی کمتری برخوردار بوده است. از آنجا که ممکن است شاخص‌های دیگر اسپرم‌شناختی از جمله سرعت شنای اسپرم، مدت زمان تحرک و درصد اسپرم‌های متحرک الزاماً بالا نباشد و نقش این شاخص‌ها چشمگیرتر باشد (Gage et al., 2004)، این نتیجه می‌تواند بدین معنی باشد که تعداد اسپرم ممکن است دارای ارتباط معنی‌داری با موفقیت لقاح باشند ولی نمی‌توانند به عنوان شاخصی مناسب برای پیش‌بینی قدرت بارورسازی اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان مطرح باشند. در مطالعه Ottesen و همکاران (۲۰۰۹)، در آزمایش رقابت اسپرم در ماهی هالیوت اقیانوس اطلس نیز نتایج مشابهی به دست آمد، به طوری که مولدی که دارای بیشترین تراکم اسپرم بود، دارای مشارکت کمتری در ایجاد نتاج بوده است. Gage و همکاران نیز در سال ۲۰۰۴ با استفاده از انگشت‌نگاری DNA ریزماهواره‌ها در ماهی آزاد اقیانوس اطلس نشان دادند که سرعت نسبی اسپرم، عامل اصلی تعیین‌کننده برتری

نکته دلالت دارد که استفاده از لقاح یک به یک مولدین نر و ماده و مخلوط نمودن و توزیع تخم‌های لقاح یافته در انکوباتورها باعث فراهم نمودن فرصت یکسان برای همه مولدین نر مورد استفاده خواهد شد تا اطلاعات ژنتیکی خود را به فرزندان انتقال دهند (Ribolli and Zaniboni-Filho, Campton, 2004) (2009).

نتایج این مطالعه نشان داد که تحت شرایط آزمایشگاهی، مدت زمان تحرک اسپرم به عنوان یک عامل کلیدی در موفقیت رقابت اسپرم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مطرح است. همچنین، مشخص شد اگر چه شاخص‌های مرتبط با تحرک اسپرم تا حدودی مشخص‌کننده میزان لاروهای منتسب به نر شماره ۲ باشند، با این وجود، در هر دو گروه تیمارهای تک‌والدی و مختلط، هنگامی که میزان مناسب اسپرم به ازای تخمک (10^7) استفاده شد، درصد موفقیت لقاح بالا ($>95\%$) بود و موفقیت لقاح به استفاده از اسپرم یک یا چند ماهی نر بستگی نداشت. استفاده غیرضروری از ترکیب اسپرم چندین ماهی در طی لقاح ممکن است منجر به نتایج ناخواسته و مشارکت تعداد اندکی از مولدین در ایجاد جمعیت شود. اختلاط اسپرم چند ماهی نر بدون آگاهی دقیق از شاخص‌های تحرک اسپرم در نهایت، می‌تواند منجر به تنوع ژنتیکی پایین، هم‌خونی و ایجاد نژادهای با شایستگی اندک شود.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر به جهت پشتیبانی مالی این پژوهش طی پژوهانه شماره ۱۲-۱/۴- پ مورخ ۸۹/۴/۱۵ تقدیر و تشکر می‌شود.

افزایش تعداد اسپرم ماهی نر، مشارکت در ایجاد نتاج آن ماهی نیز افزایش دارد (Neff et al., 2003). دلیل اصلی که می‌توان برای بروز پدیده رقابت اسپرم در میان مولدین نر و کاهش اندازه جمعیت مؤثر مولدین و نتیجتاً کاهش سطح تنوع ژنتیکی در گونه‌هایی مثل ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان اشاره کرد، اتخاذ الگوی نامناسب در مراکز تکثیر مصنوعی است. بر اساس نتایج الگوهای متفاوت لقاح که در تیمارهای اصلی و شاهد این تحقیق بررسی شدند، می‌توان اذعان نمود که انجام لقاح یک به یک مولدین نر و ماده که به صورت تصادفی انتخاب می‌شوند گزینه مناسبی برای بهره‌گیری از تمام ظرفیت مولدین موجود در انتقال ذخیره ژنتیکی لاروهاست. لقاح یک به یک مولدین نر و ماده و توزیع یکنواخت تخم‌های لقاح یافته در انکوباتورها، مشارکت ژنتیکی مولدین خصوصاً مولدین نر را در تولید لاروها نسبت به شیوه لقاح مخلوط گامت‌ها متعادل‌تر می‌نماید، از این رو، باعث افزایش اندازه جمعیت مؤثر در مولدین خواهد شد. البته استفاده از روش تلاقی‌های همگانی نیز به عنوان یکی از راه‌حل‌های بسیار مناسب مطرح است. در این روش، به منظور افزایش تنوع ژنتیکی، تمامی مولدین ماده با تمامی مولدین نر آمیزش می‌یابند. با فراهم آوردن چندین جفت برای هر کدام از ماهیان، به ویژه در مواردی که ناباروری وجود داشته باشد، بحران‌های موجود تعدیل می‌شوند. با اعمال این روش علیرغم آن که زاد و ولد کلی هر مولد ماده کاهش خواهد یافت، اما همه آنها در تولید نسل سهمیم هستند (Halleran, 2003). تحقیقاتی که اخیراً به بررسی شیوه تکثیر مصنوعی مولدین پرداخته است نیز بر این

منابع

- سوری‌نژاد، ا. (۱۳۸۹) ارزیابی تأثیر رقابت اسپرم هنگام لقاح مخلوط گامت مولدان ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* بر میزان تنوع ژنتیکی نسل F1. پایان نامه دکتری، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
- علیزاده، م. (۱۳۸۶) برنامه راهبردی تحقیقات ماهیان سردآبی. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تنکابن.
- مهرابی، ی. (۱۳۸۱) بیهوشی و روش عمل تکثیر دو بار در سال ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. انتشارات اصلانی، تهران.
- Aas, G. H., Refstie, T. and Gjerde, B. (1991) Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture* 95: 125-132.
- Ball, M. A., and Parker G. A. (1998) Sperm competition games: a general approach to risk assessment. *Journal of Theoretical Biology* 194: 251-262.
- Birkhead, T. R. and Møller, A. P. (1998) Sperm competition and sexual selection. Academic Press, London.
- Birkhead, T. R., Martinez, J. G., Burke, T. and Froman, D. P. (1999) Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences* 266: 1759-1764.
- Borrell, Y. J., Álvarez, J., Vázquez, E., Pato, C. F. and Tapia, C. M. (2004) Applying microsatellites to the management of farmed turbot stocks (*Scophthalmus maximus* L.) in hatcheries. *Aquaculture* 241: 133-150.
- Butts, I. A., Trippel, E. A., and Litvak, M. K. (2009) The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod *Gadus morhua*. *Aquaculture* 286: 89-94.
- Buyukhatipoglu, S. and Holtz, W. (1984) Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture* 37: 63-71.
- Campton, D. E. (2004) Sperm competition in salmon hatcheries: the need to institutionalize genetically benign spawning protocols. *Transactions of the American Fisheries Society* 133: 1277-1289.
- Casselman, S. J., Schulte-Hostedde, A. I. and Montgomerie, R. (2006) Sperm quality influences male fertilization success in walley (*Sander vitreus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63: 2119-2125.
- Castro, J., Bouza, C., Presa, P., Pino-Querido, A., Riaza, A., Ferreiro, I., Sánchez, L. and Martínez, P. (2004) Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture* 242: 119-135.
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B and Volckaert, A. M. F. (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function. *Aquaculture* 255: 1-29.
- Dreanno, C., Suquet, M., Desbruyeres, E., Cosson, J., Delliou, H. and Billard, R. (1998) Effect of urine on semen quality in turbot, *Psetta maxima*. *Aquaculture* 169: 247-262.
- Gage, M. J. G., Macfarlane, C. P., Yeates, S., Ward, R. G., Searle, J. B. and Parker, G. A. (2004) Spermatozoa traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Current Biology* 14: 44-47.
- Geffen, A. J. and Evans, J. P. (2000) Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 182: 61-72.
- Hallerman, E. M. (2003) Population genetics: principles and applications for fisheries scientists. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.

- Hara, M and Sekino, M. (2000) Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture* 217: 107– 114.
- Herbinger, C. M., Roger, W. D., Pitman, R. P., Plaquet, D., Mesa, K. A., Morris, D. B., Wright, J. M. and Cook, D. (1995) DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture* 137: 245-256.
- Jackson, T. R., Martin-Robichaud, D. J. and Reith, M. E. (2003) Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock. *Aquaculture* 220: 245-259.
- Johnson, N. A., Rexroad III, C. E., Hallerman, E. M., Vallejo, R. L. and Palti, Y. (2007) Development and evaluation of a new microsatellite multiplex system for parental allocation and management of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstocks. *Aquaculture* 266: 53-62
- Kamler, E. (2005) Parent-egg-progeny relationships in teleost fishes: an energetic perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15: 399-421.
- Kim, S. G, Morishima, K., Satoh, N., Fujioka, T., Saito, A. and Arai, K. (2007) Parentage assignment in hatchery population of brown sole *Pleuronectes herzensteini* by microsatellite DNA markers. *Fisheries Science* 73: 1087-1093.
- McDonald, G. J., Danzmann, R. G. and Ferguson, M. M. (2004) Relatedness determination in the absence of pedigree information in three cultured strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 233: 65-78.
- McQuown, E. C., Sloss, B. L., Sheehan, R. J., Rodzen, J., Tranah, G. and May, B. (2000) Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon: new sturgeon primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser*. *Transactions of the American Fisheries Society* 139: 1380-1388.
- Nagler, J. J., Parsons, J. E. and Cloud, J. G. (2000) Single pair mating indicates maternal effects on embryo survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 184: 177-183.
- Neff, B. D., Fu, P. and Gross, M. R. (2003) Sperm investment and alternative mating tactics in bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral Ecology* 14: 634-641.
- Nilsson, E. and Cloud, J. G. (1992) Rainbow trout chimeras produced by injection of blastomeres into recipient blastulae. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 89: 9425-9428.
- Ottesen, O. H., Babiak, I. and Dahle, G. (2009) Sperm competition and fertilization success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 286: 240-245.
- Parker, G. A. (1990) Sperm competition games: raffles and roles. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences* 242: 120-126.
- Perez-Enrique, R. and Tanigushi, N. (1999) Use of microsatellite DNA as genetic tags for the assessment of a stock enhancement program of Red Sea bream. *Fisheries Science* 65: 374-379.
- Pourkazemi, M. (1996) Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the south Caspian Sea. Ph.D Thesis. University of Wales, Swansea.
- Ribeiro, Â., Morán, P. and Caballero, A. (2008) Genetic diversity and effective size of the Atlantic salmon *Salmo salar* L. inhabiting the River Eo (Spain) following a stock collapse. *Journal of Fish Biology* 72: 1933-1944.
- Ribolli, J. and Zaniboni-Filho, E. (2009) Individual contributions to pooled-milt fertilizations of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Neotropical Ichthyology* 7: 629-634.
- Rideout, R. M., Trippel, E. A. and Litvak, M. K. (2004) Paternal effects on haddock, *Melanogrammus*

- aeglefinus* L., early life history traits. *Journal of Fish Biology* 64: 695-701.
- Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F. and Nash, J. P. (2004) The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234: 1-28.
- Scott, A. P. and Baynes, S. M. (1980) A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology* 17: 707-739.
- Sekino, M., Sugaya, T., Hara, M. and Taniguchi, N. (2004) Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 233: 163-172.
- Snook, R. R. (2005) Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 46-53.
- Springate, J. R. C., Bromage, N. R., Elliot, J. A. K. and Hudson, D. L. (1984) The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eyeing, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture* 43: 313-322.
- Trippel, E. A. and Neilson, J. D. (1992) Fertility and sperm quality of virgin and repeatspawning Atlantic cod (*Gadus morhua*) and associated hatching success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49: 2118-2127.
- Tuest, V. M., Dietrich, G. J., Wojtczak, M., Slowinska, M., Moneserrat, J. D. and Cierreszko, A. (2008) Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology* 24: 393-397.
- Tvedt, H. B., Benfey, T. J., Martin-Robichaud, D. J. and Power, J. (2001) The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilisation success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture* 194: 191-200.
- Vandeputte, M., Kocour, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M., De Guerry, D., Rodina, M., Gela, D., Vallod, D., Chevassus, B. and Linhart, O. (2004) Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 235: 223-236.
- Williot, P., Kopeika, E. F. and Goncharo, B. F. (2000) Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). *Aquaculture* 189: 53-61.
- Wilson, A. J. and Ferguson, M. M. (2002) Molecular pedigree analysis in natural populations of fishes: approaches, applications and practical considerations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 1696-1707.

حفظ چندشکلی نشانگرهای ژن *GJB2* در جمعیت ایرانی به واسطه انتخاب متعادل

حلیمه رضایی^۱، زهرا فاضلی عطار^{۱،*}، مرجان مجتوبی نائینی^۱ و صادق ولیان بروجنی^{۱*}
^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
^۲ گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

ژن *GJB2* کانکسین ۲۶ را که یک پروتئین رابط بین سلولی مهم در پوست است، کد می‌کند. کانکسین ۲۶ یک پروتئین سرتاسری غشاء است که در مسیر بازسازی یون پتاسیم در گوش داخلی نقش دارد. در این مطالعه، آزمون‌های خنثی (neutrality) بر روی اطلاعات ژنوتیپی به دست آمده از سه نشانگر چندشکلی SNP1245، D13S141 و D13S175 واقع در ناحیه ژن *GJB2* اجرا شد. مجموعه برنامه‌های کامپیوتری آنالیز ژنتیک جمعیت، PyPop و Ppogene32، برای آنالیز اطلاعات به دست آمده از جمعیت ایرانی استفاده شد. ارزش Fnd سه نشانگر SNP1245، D13S141 و D13S175 در جمعیت ایرانی به ترتیب ۰/۵۹۸۰، ۱/۰۱۵۵ و ۰/۶۴۵۷- ولی بدون ارزش معنی‌دار P تخمین زده شد که بیانگر تأثیر انتخاب متعادل بر روی نشانگرهای چندشکلی در ژن *GJB2* است. در جمعیت مطالعه شده، ارزش F هر سه نشانگر چندشکلی در داخل ناحیه L95 و U95 ارزش F مورد انتظار واقع شده است که نشان‌دهنده عدم تأثیر ناکارآمدی (hitchhiking) ژنتیکی بر روی نشانگرهای ناحیه ژنی *GJB2* است. نتایج به دست آمده از این مطالعه بیانگر آن است که چندشکلی این سه نشانگر در ژن *GJB2* به واسطه ارزش سازگاری بالاتر هتروزیگوت‌ها در جمعیت ایرانی حفظ شده است.

واژه‌های کلیدی: آزمون neutrality، انتخاب متعادل، جمعیت ایرانی، ژن *GJB2*

مقدمه

در مطالعه‌ای که به تازگی بر روی جمعیت ناشنوایان ایرانی صورت گرفته است، شیوع آلل‌های جهش یافته ژن *GJB2* در بیماران مبتلا به ناشنوایی در ایران ۱۹/۹ درصد گزارش شده است. به نظر می‌رسد که جهش‌های ژن *GJB2* در جمعیت ناشنوای ایرانی همانند

بسیاری از جمعیت‌های دنیا شیوع بالایی دارد (Daneshi et al., 2011). ژن پروتئین اتصالات شکاف بتا-۲ (*GJB2*) شایع‌ترین ژن عامل بروز فقدان شنوایی توارثی غیرسندرومی در گروه‌های قومی مختلف است (Zelante et al., 1997؛ Estivill et al., 1998؛ Kelley et al., 1998). کانال‌های اتصال شکاف،

CFTR دارند. جهش‌های ژن *CFTR* می‌تواند تهاجم سالمونلا تیفی (*Salmonella*) را به سلول‌های اپی‌تلیال محدود کند و باعث حفاظت در برابر تب تیفوئید گردد (Pier et al., 1998؛ Adamo et al., 2009).

در این بررسی، آزمون‌های neutrality بر روی اطلاعات ژنوتیپی به دست آمده از مطالعه جمعیت ایرانی برای سه نشانگر چندشکلی SNP1245، D13S175 و D13S141 که در ناحیه ژنی *GJB2* قرار دارند، اجرا شد. نتایج این مطالعه می‌تواند درک ما را از نقش انتخاب بر روی ژن *GJB2* در جمعیت ایرانی افزایش دهد.

مواد و روش‌ها

نمونه خون: این مطالعه بر روی ۱۰۰ فرد غیرخویشاوند سالم از افراد مراجعه کننده به مرکز ژنتیک پزشکی اصفهان انجام شد. این افراد به صورت تصادفی ساده از استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری، اهواز، تهران، تبریز و یزد انتخاب شدند که به عنوان نمونه‌ای از جمعیت ایرانی مورد مطالعه قرار گرفتند. از هر فرد، ۱۰ میلی‌لیتر خون بر روی محلول EDTA جمع‌آوری شد.

تعیین ژنوتیپ: ژنوتیپ نشانگرهای SNP1245، D13S175 و D13S141 بر روی نمونه DNA ژنومی افراد مطالعه شده با استفاده از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۲ درصد تفکیک شدند سپس اندازه قطعات با مقایسه با نشانگرهای اندازه تعیین شدند. توالی پرایمرها و شرایط واکنش PCR در منبع Rezaei و Vallian (۲۰۱۱) توضیح داده شده است.

سیتوپلاسم سلول‌های مجاور را به هم متصل می‌کند و امکان انتشار یون‌ها و متابولیت‌های کوچک را فراهم می‌سازد (Bruzzone et al., 1996؛ Martinez et al., 2009). مشخص شده است که پروتئین GJB2 اتصالات شکاف بین سلول‌های بافت اپی‌تلیال و پیوندی در حلزون گوش را تشکیل می‌دهد و در بازسازی یون‌های پتاسیم درون لنف، مؤثر در فرآیند انتقال صدا، نقش دارد (Kikuchi et al., 1995).

مشخص شده است که افراد هموزیگوت و هتروزیگوت برای جهش شایع ژن *GJB2* در آفریقا، R143W، پوست برون‌ی ضخیم‌تر و ترشح بیشتری از کلرید و سدیم در عرق نسبت به سایر افراد سالم خانواده دارند. این مشاهدات پیشنهاد کننده آن است که فنوتیپ‌های پوست بیرونی که همراه با جهش‌های ژن *GJB2* است، ممکن است مکانیسم حفاظتی در برابر تهاجم پاتوژن‌ها را فراهم سازد (Meyer et al., 2002). بررسی جهش‌های M34T، W44C و R143W در ژن *GJB2* آشکار ساخته است که جهش‌های ژن *GJB2* می‌تواند بقا سلول را در برابر عوامل عفونی افزایش دهد (Common et al., 2004). مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که سلول‌های بیان کننده جهش R143W در مقایسه با سلول‌های وحشی، حساسیت کمتری نسبت به تهاجم سلولی پاتوژن *Shigella flexneri* دارند (Man et al., 2007). نتایج بررسی‌های متعدد باز شدن کانکسین ۲۶ توسط باکتری شیگلا (*Shigella*) را تأیید می‌کند که ممکن است در پیشرفت تهاجم باکتریایی نقش داشته باشد (Tran et al., 2003). به نظر می‌رسد که حاملین جهش‌های ژن *GJB2* مزیت هتروزیگوتی مشابه با مزیت هتروزیگوسیستی حاملین جهش‌های ژن

محاسبه گردید و ارزش *F_{nd}* هم برای نشانگرهای SNP1245، D13S141 و D13S175 در جمعیت ایرانی به ترتیب ۰/۵۹۸۰، -۱/۰۱۵۵ و ۰/۶۴۵۷- ولی بدون ارزش معنی دار *P* تخمین زده شد (جدول ۲). نتایج حاصل از اجرا آزمون‌های neutrality بر روی سه نشانگر مطالعه شده در این تحقیق بیانگر آن است که احتمالاً این سه نشانگر در جمعیت ایرانی تحت تأثیر انتخاب متعادل قرار دارند.

جدول ۱- تخمین مقدار هموزیگوسیتی مشاهده شده، حد پایین اطمینان ۹۵ درصد و حد بالای اطمینان ۹۵ درصد برای نشانگرهای SNP1245، D13S141 و D13S175 در جمعیت ایرانی با استفاده از برنامه Popgene32. *K*=تعداد آلل‌ها، *F*= هموزیگوسیتی مشاهده شده، *L*95= حد پایین اطمینان ۹۵ درصد، *U*95= حد بالای اطمینان ۹۵ درصد.

جایگاه ژنی	k	F	L95	U95
SNP1245	۲	۰/۷۳۱۲	۰/۵۰۲۴	۰/۹۹۰۱
D13S141	۴	۰/۴۲۲۰	۰/۳۲۰۴	۰/۹۴۱۳
D13S175	۷	۰/۳۲۵۵	۰/۲۲۰۴	۰/۷۷۰۸

جدول ۲- تخمین مقدار هموزیگوسیتی مشاهده شده، هموزیگوسیتی مورد انتظار و انحراف نرمال هموزیگوسیتی نشانگرهای SNP1245، D13S141 و D13S175 در جمعیت ایرانی با استفاده از برنامه PyPop. *F_{nd}*= انحراف نرمال هموزیگوسیتی، *F*= هموزیگوسیتی مشاهده شده، *F[^]*= هموزیگوسیتی مورد انتظار.

جایگاه ژنی	F	F [^]	F _{nd}	P
SNP1245	۰/۷۳۱۲	۰/۸۳۱۴	-۰/۵۹۸۰	۰/۲۸۴۲
D13S141	۰/۴۲۲۰	۰/۶۱۰۲	-۱/۰۱۵۵	۰/۱۷۰۵
D13S175	۰/۳۲۵۵	۰/۴۲۲۹	-۰/۶۴۵۷	۰/۳۰۹۶

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ای که بر روی جمعیت اصفهان صورت گرفته است، مشخص شده است که هاپلو تیپ‌های نشانگرهای *BgIII-EcoRI* در ژن فنیل آلانین

تحلیل آماری نتایج: اطلاعات ژنوتیپی افراد سالم برای تهیه فایل ورودی در دو نرم‌افزار Popgene32 و PyPop برای مطالعه جمعیتی استفاده شد. ارزش هموزیگوسیتی مشاهده شده (*F*)، حد پایین اطمینان ۹۵ درصد (*L*95) و حد بالای اطمینان ۹۵ درصد (*U*95)، ارزش هموزیگوسیتی مورد انتظار (*F[^]*) و انحراف نرمال هموزیگوسیتی (*F_{nd}*) برای هر کدام از نشانگرها به طور جداگانه با استفاده از برنامه‌های Popgene32 نسخه ۱/۳۱ (www.ualberta.ca) و PyPop (Lancaster *et al.*, 2003) تخمین زده شدند.

مشاهدات

تکثیر ناحیه مربوط به نشانگر SNP1245 قطعه‌ای با طول ۲۸۹ جفت باز تولید کرد. در صورتی که نوکلئوتید T در موقعیت ۱۲۴۵ وجود داشته باشد، هضم آنزیمی با آنزیم *BanI* تولید باندهای ۲۴۵ و ۴۴ جفت باز را می‌کند. نوکلئوتید C در موقعیت ۱۲۴۵ یک جایگاه اضافی برای هضم آنزیمی با آنزیم *BanI* را ایجاد کرد و در نتیجه سه باند ۱۴۸، ۹۷ و ۴۴ جفت باز را تولید می‌کند. برای نشانگرهای D13S141 و D13S175 به ترتیب ۴ و ۷ آلل مختلف در جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد. آزمون neutrality با استفاده از اطلاعات ژنوتیپی برای نشانگرهای SNP1245، D13S141 و D13S175 واقع در ناحیه ژنی *GJB2* اجرا شد. نتایج به دست آمده با برنامه Popgene32 و PyPop به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. ارزش *F* برای هر سه نشانگر مطالعه شده در حدواسط *L*95 و *U*95 قرار داشت (جدول ۱). ارزش *F[^]* برای هر سه نشانگر مورد مطالعه کوچکتر از ارزش *F[^]*

مشاهده می‌شود، ارزش F محاسبه شده برای نشانگرهای مطالعه شده در این تحقیق کوچکتر از ارزش F^A است و ارزش F_{nd} نیز منفی است. در صورتی که $F > F^A$ باشد و ارزش F_{nd} نیز عددی مثبت باشد، می‌توان نتیجه گرفت که نشانگر یا جایگاه ژنی مورد مطالعه تحت تأثیر انتخاب جهت‌دار قرار دارد. ارزش F_{nd} منفی و $F < F^A$ بیانگر آن است که نشانگر یا جایگاه ژنی مطالعه شده در جمعیت تحت تأثیر انتخاب متعادل قرار دارد. نتایج آزمون neutrality سه نشانگر چندشکلی ژن $GJB2$ که با نرم‌افزار Pypop به دست آمده است، اشاره بر آن دارد که نشانگرهای مورد مطالعه در این تحقیق در جمعیت ایرانی تحت تأثیر انتخاب متعادل قرار دارند.

موانع جمعیتی، فرآیندهای تکاملی هستند که مانع تولید مثل درصد بالایی از جمعیت می‌گردند. موانع جمعیتی می‌تواند باعث افزایش درون زادآوری یا اثر بنیان‌گذار گردد که معمولاً باعث کاهش هتروزیگوسیتی می‌گردد. هتروزیگوسیتی مشاهده شده نشانگر $D13S175$ در جمعیت مورد مطالعه ۵۳ درصد برآورد شده است. از میان ۷ آلل مشاهده شده برای نشانگر $D13S175$ در جمعیت ایرانی آلل ۳ بالاترین فراوانی را نشان می‌دهد و فراوانی تقریباً برابر با ۰/۵ دارد. از میان ۵۳ درصد افراد هتروزیگوت مشاهده شده، ۴۲ درصد افراد مورد مطالعه برای آلل ۳ هتروزیگوت بودند. به نظر می‌رسد، ژنوتیپ هتروزیگوت برای آلل ۳ نشانگر $D13S175$ در جمعیت ایرانی، سازگاری زیستی و تولید مثلی بالاتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها به افراد می‌دهد. نتایج حاصل از اجرای آزمون neutrality بر روی نشانگر $D13S175$ (جدول ۲) نیز تأییدکننده اثر انتخاب متعادل بر روی این نشانگر است. در مورد نشانگر $D13S141$ ، هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت

هیدروکسیلاز (PAH) در جمعیت اصفهان تحت تأثیر انتخاب متعادل قرار دارند (Fazeli and Vallian, 2010). پس از آن، به منظور افزایش آگاهی در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت‌های ایرانی، اثر انتخاب بر روی سه نشانگر واقع در ناحیه ژنی $GJB2$ بررسی شد. نشانگرهای $SNP1245$ ، $D13S141$ و $D13S175$ به ترتیب در ناحیه پروموتوری، انتهای سانترومری و تلومیری ژن $GJB2$ قرار دارند.

با استفاده از اطلاعات ژنوتیپی ۱۰۰ فرد غیرخویشاوند، ارزش F (هموزیگوسیتی مشاهده شده) هر سه نشانگر $SNP1245$ ، $D13S175$ و $D13S141$ محاسبه گردید. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، ارزش F محاسبه شده در حد پایین اطمینان ۹۵ درصد ($L95$) و حد بالای اطمینان ۹۵ درصد ($U95$) ارزش F مورد انتظار قرار داشت. در صورتی که ارزش F خارج از مقدار حدواسط $L95$ و $U95$ قرار داشته باشد، نشانگر مورد بررسی تحت hitchhiking ژنتیکی قرار خواهد داشت و نیروی انتخاب مؤثر بر روی نشانگر یا جایگاه ژنی دیگر بر روی فراوانی آللی و هتروزیگوسیتی نشانگر مورد مطالعه تأثیر خواهد گذاشت. بر اساس نتایج به دست آمده از برآورد ارزش F نشانگرهای مطالعه شده با نرم‌افزار Popgene32، به نظر نمی‌رسد که این سه نشانگر چندشکلی در جمعیت ایرانی تحت تأثیر hitchhiking ژنتیکی قرار داشته باشند.

مقدار هموزیگوسیتی مشاهده شده (F)، هموزیگوسیتی مورد انتظار (F^A) و انحراف نرمال هموزیگوسیتی (F_{nd}) سه نشانگر $SNP1245$ ، $D13S141$ و $D13S175$ در جمعیت ایرانی با نرم‌افزار Pypop تخمین زده شد. همان‌طور که در جدول ۲

تقریباً ۲۴ درصد برآورد می‌شود، نتایج آزمون neutrality نشانگر SNP1245 بیانگر آن است که افراد هتروزیگوت با ژنوتیپ C/T در جمعیت ایرانی سازگاری زیستی بالاتری نسبت به افراد هموزیگوت دارند.

نتایج به دست آمده در این پژوهش، حاکی از تأثیر انتخاب متعادل بر روی نشانگرهای SNP1245، D13S141 و D13S175 ژن *GJB2* در جمعیت ایرانی است. به نظر می‌رسد که چندشکلی نشانگرهای ژن *GJB2* در جمعیت ایرانی توسط انتخاب متعادل حفظ می‌شود.

ایرانی به میزان ۶۰ درصد برآورد شده است. آلل ۲ در مقایسه با سایر آلل‌های مشاهده شده برای نشانگر D13S141 فراوانی بالای ۰/۵ نشان می‌دهد که ۵۶ درصد افراد مطالعه شده برای آلل ۲ هتروزیگوت هستند. به نظر می‌رسد که هتروزیگوت بودن برای آلل ۲ نشانگر D13S141 نیز همانند ژنوتیپ هتروزیگوت برای آلل ۳ نشانگر D13S175 مزیت زیستی بالاتری را به افراد اعطا می‌کند. این نتایج با نتایج آزمون neutrality نشانگر D13S141 همخوانی دارد (جدول ۲).

اگر چه هتروزیگوسیته مشاهده شده برای نشانگر SNP1245 در جمعیت ایرانی مورد مطالعه بسیار پایین و

منابع

- Adamo, P. D., Guerci, V. I., Fabretto, A., Faletra, F., Grasso, D. L., Ronfani, L., Montico, M. and Morgutti, M. (2009) Does epidermal thickening explain *GJB2* high carrier frequency and heterozygote advantage?. *European Journal of Human Genetics* 17: 284-286.
- Bruzzone, R., White, T. and Paul, D. (1996) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *European Journal Biochemistry* 238: 1-27.
- Common, J. E., Davies, D. and Kelsell, D. P. (2004) Further evidence for heterozygote advantage of *GJB2* deafness mutations: a link with cell survival. *Journal of Medical Genetics* 41: 573-575.
- Daneshi, A., Hassanzadeh, S., Emamdjomeh, H., Mohammadi, SH., Arzhang, S., Farhadi, M. and Najmabadi, H. (2011) Prevalence of *GJB2*-associated deafness and outcomes of cochlear implantation in Iran. *Journal of Laryngology and Otology* 31: 1-5.
- Estivill, X., Fortina, P. and Surrey, S. (1998) Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 351: 394-398.
- Fazeli, Z. and Vallian, S. (2010) Evidences for balancing selection from PAH-*Bgl*III and PAH-*Eco*RI polymorphisms in Isfahan population. *Journal of Taxonomy and Biosystematics* 1(1): 73-80.
- Kelley, P., Harris, D. and Comer, B. (1998) Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *American Journal of Human Genetics* 62: 792-799.
- Kikuchi, T., Kimura, R. and Paul, D. (1995) Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anatomy and embryology* 191: 101-118.
- Lancaster, A., Nelson, M. P., Single, R. M., Meyer, D. and Thomson, G. (2003) PyPop: a software framework for population genomics: analyzing large-scale multi-locus genotype data. *Pacific Symposium on Biocomputing* 8: 514-525.
- Man, Y. K., Trollove, C. and Tattersall, D. (2007) A deafness-associated mutant human connexin 26 improves the epithelial barrier in vitro. *Journal of Membrane Biology* 218: 29-37.
- Martinez, A., Acuna, R. and Figueroa, V. (2009) Gap-junction channels dysfunction in deafness and

- hearing loss. *Antioxidant and Redox Signaling* 11: 309-322.
- Meyer, C. G., Amedofu, G. K., Brandner, J. M., Pohland, D., Timmann, C. and Horstmann, R. D. (2002) Selection for deafness?. *Nature Medicine* 8: 1332-1333.
- Pier, G. B., Grout, M. and Zaidi, T. (1998) *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393: 79-82.
- Tran, V. N., Hieu, G., Clair, C., Bruzzone, R. (2003) Connexin-dependent inter-cellular communication increases invasion and dissemination of *Shigella* in epithelial cells. *Nature Cell Biology* 5: 720-726.
- Rezaei, H. and Vallian, S. (2011) BanI/D13S141/D13S175 Represents a novel informative haplotype at the *GJB2* gene region in the Iranian population. *Cellular and Molecular Neurobiology* 5: 749-754.
- Zelante, L., Gasparini, P. and Estivill, X. (1997) Connexin26 mutations associated with the most common form of nonsyndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Human Molecular Genetics* 6: 1605-1609.

بررسی تاکسونومی عددی *Trifolium resupinatum* L. (شبر ایرانی) و *Trifolium fragiferum* L. (شبر توت‌فرنگی) با استفاده از ریزماهوره‌های جدید

مریم حائری نسب^۱* و پیمان آقایی^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

^۲ مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵، ج. ا. ایران

چکیده

Trifolium resupinatum و *T. fragiferum* دو گونه زراعی مهم تیره باقلانیان هستند. *T. fragiferum* به عنوان بخشی از خزانه وراثتی *T. resupinatum* در نظر گرفته شده است. در این مطالعه، ضمن بررسی انتقال‌پذیری زوج آغازگرهای *T. pratense* و *T. repens* به ژنوتیپ این دو گونه و معرفی نشانگرهای SSR (ریزماهوره‌های) جدید برای این گونه‌ها، میزان شباهت ژنومی آنها با استفاده از نشانگرهای SSR، به روش تاکسونومی عددی ارزیابی شد. نتایج حاصل از این مطالعه، حاکی از سطح بالای انتقال‌پذیری و چندشکلی ریزماهوره‌های معرفی شده برای *T. pratense* و *T. repens* به گونه‌های *T. fragiferum* و *T. resupinatum* بود. مطالعات نشان داد که در این گونه‌ها تنوع بین جمعیتی زیاد بوده، دو گونه در خوشه‌هایی با شباهت بسیار اندک دسته‌بندی شدند که نشانگر تفاوت ژنومی آنها در جایگاه‌های ژنی SSR آزموده شده است. این مطالعه نشان داد که ریزماهوره‌ها می‌توانند ابزار مفیدی برای بررسی تنوع ژنتیکی در این گونه‌ها باشند. نتایج این بررسی پیشنهاد می‌کند تا زمانی که جفت آغازگرهای SSR اختصاصی برای این دو گونه طراحی نشده است، می‌توان با ضریب اطمینان بالایی از آغازگرهای SSR به دست آمده از *T. pratense* و *T. repens*، برای تحلیل ژنوم در این گونه‌ها استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: شبر ایرانی (*Trifolium resupinatum*)، شبر توت‌فرنگی (*T. fragiferum*)، SSR، تحلیل

تاکسونومی عددی، ایران

مقدمه

Lindley یکی از مهم‌ترین جنس‌های گیاهی از نظر زراعی و تعداد گونه (۲۵۵ گونه در جهان) است (Ellison et al., 2006). این جنس خویشاوندی بسیار

جنس شبر (*Trifolium* L.) متعلق به طایفه Trifolieae Brongniart از تیره باقلانیان (Fabaceae)

گیاهی چندساله با عادت رشد به طور عمده خوابیده و دارای ساقه‌های رونده (stolon) است که علاوه بر تکثیر جنسی به وسیله بذر با قطعه قطعه شدن ساقه به طریق رویشی، قابلیت تکثیر دارد. با اینکه این گونه پتانسیل استفاده در سیستم‌های مرتع و چراگاهی را دارد، اما هنوز در کشور به عنوان گونه زراعی مورد استفاده قرار نگرفته است. این گونه به دلیل ساقه‌زایی بالا، فقدان گُرک در بیشتر جمعیت‌ها، نرمی بافت رویشی، تولید بیوماس بالا و سازگاری با خاک‌های شور و قلیایی (Taylor and Gillett, 1988) می‌تواند یکی از مناسب‌ترین گونه‌ها در مراتع و چراگاه‌های پایا باشد. همچنین، در صورت نیاز به‌نژادگران در برنامه‌های دو رنگ‌گیری با شبدر ایرانی استفاده شود (عباسی، ۱۳۸۷). دامنه پراکنش جغرافیایی *T. fragiferum*، اروپا، قبرس، ترکیه، ایران، قفقاز و سوریه است و در نواحی شمال، شمال غرب، غرب و مرکز ایران می‌روید، در حالی که *T. resupinatum* در نواحی بالکان، آسیای میانه، ترکیه، ایران، روسیه، عراق، سوریه، فلسطین و مصر گسترش یافته، در بخش‌های شمال، غرب، جنوب غرب و مرکز ایران پراکنده است (Heller, 1984).

ریزماهورها یا نشانگرهای مولکولی SSR شامل توالی‌های تکراری ساده با واحدهای ۱ تا ۶ نوکلئوتیدی هستند که به دلیل مزایای زیادی که نسبت به سایر نشانگرهای مولکولی دارند بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. از جمله مزایای آنها می‌توان به کاربرد آسان، سادگی تفسیر نتایج، میزان بالای تنوع، فراوانی و تنوع زیاد آلل‌ها در سطح ژنوم یوکاریوت‌ها، الگوی توارث هم‌پارز و تکرارپذیر بودن نتایج اشاره کرد. این مزایا سبب شده تا این نشانگر مولکولی به طور وسیع در تهیه نقشه‌های ژنتیکی، تخمین تنوع ژنتیکی، مطالعه روابط

نزدیکی با جنس‌های *Medicago L.*, *Trigonella L.* و *Melilotus Miller* دارد. بدون شک، ناحیه مدیترانه‌ای مرکز کشت و به‌نژادی بیشترین گونه‌های زراعی جنس شبدر است (Zohary and Heller, 1984). گونه‌های مختلف جنس شبدر علاوه بر استفاده به صورت علوفه، به طور وسیع در زنبورداری و به ندرت به عنوان سبزیجات خوراکی و دارویی استفاده می‌شوند (Zohary and Heller, 1984). شبدر پس از یونجه (*Medicago*) مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای دو لپه‌ای است که با سطح کشت حدود یکصد هزار هکتار جایگاه ویژه‌ای در کشور دارد (زمانیان، ۱۳۸۴) و باعث افزایش شدید نیتروژن خاک شده، مبنای تناوب کشت را تشکیل می‌دهد (جود و همکاران، ۱۳۸۲). مهم‌ترین گونه‌های زراعی جنس *Trifolium* در ایالات متحده که بیشترین کشت و زراعت شبدر را در جهان دارد گونه‌های *T. pretense* L. (شبدر قرمز)، *T. repens* L. (شبدر سفید)، *T. incarnatum* L. (شبدر لاک‌ی) و *T. hybridum* L. (شبدر دو رنگ) هستند (Taylor, 1985)، در حالی که در ایران مهم‌ترین گونه زراعی کشور با سطح زیر کشت حدود ۱۰۰ هزار هکتار *Trifolium resupinatum* L. (شبدر ایرانی) است (عباسی و زمانیان، ۱۳۸۴). شبدر ایرانی، گیاهی یک‌ساله با دو فصل رویش بهار و زمستان است. گونه *T. Clusii* Godr. & Gren. خزانه ژنی دوم و گونه *T. fragiferum* L. (شبدر توت‌فرنگی) خزانه ژنی سوم این گونه هستند (Taylor and Gillett, 1988). زمانی که به‌نژادگران نتوانند آلل‌های موردنظرشان را از خزانه ژنی اول (تمام ارقام و کولتیوارهای اصلاح شده جمعیت‌های بومی و جمعیت‌های خودرو در هر گونه زراعی) به دست آورند، خزانه‌های ژنی دوم و سوم را جستجو می‌نمایند (Fehr, 1987). شبدر توت‌فرنگی،

ریزماهوره‌های جدید در گونه‌های *T. resupinatum* و *T. fragiferum* معرفی گردید.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، ۱۹ جمعیت خودرو شامل ۸ جمعیت از *T. fragiferum* و ۱۱ جمعیت از *T. resupinatum* ارزیابی شد. نمونه‌های جمعیتی به گونه‌ای انتخاب شد که تمامی دامنه پراکنش این گونه‌ها در ایران را پوشش دهد. مشخصات مربوط به این جمعیت‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. نمونه‌ها در فصول رویشی سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ به صورت بذر و نمونه هرباریومی توسط مؤلف جمع‌آوری و نمونه‌های سند به هرباریوم دانشگاه اصفهان (HUI) سپرده شد. نمونه‌ها بر اساس کلید ارائه شده در فلورا ایرانیکا (Heller, 1984) شناسایی شدند. بذرها در شرایط گلخانه‌ای کشت و DNA ژنومی از برگ‌های تازه و جوان استخراج گردید. استخراج DNA از این جمعیت‌ها با روش CTAB تغییر یافته (Lefort and Douglas, 1999) انجام گرفت.

غلظت DNA استخراج شده، توسط الکتروفورز افقی، مشاهده بر روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد و مقایسه با الگوی نشانگر مولکولی λ III (Lambda III) با وزن مولکولی مشخص به عنوان شاهد ارزیابی شد.

در این تحقیق، ۲۲ جفت از آغازگرهای مشترک بین *T. pratense* و *T. repens* که با احتمال بیشتری قادر به تکثیر ریزماهوره‌ها و بیان تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *T. resupinatum* و *T. fragiferum* هستند، انتخاب شدند (جدول ۲). انتخاب این آغازگرها بر اساس اشتراک بین دو گونه *T. pratense* و *T. repens*، چندشکلی و فراوانی آللی بالا صورت گرفت.

خویشاوندی و همچنین در برنامه‌های به‌نژادی در گیاهان مورد استفاده قرار گیرد. از جمله معایب این نشانگر پیچیدگی و صرف هزینه و وقت زیاد را می‌توان نام برد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۴). در جنس شبدر، از این نشانگرها تنها در آنالیز ژنوم گونه‌های *T. pratense* و *T. repens* استفاده شده است (Sato et al., 2005؛ Zhang, Zhang et al., 2007؛ Dias et al., 2008؛ Sato, 2010) و همکاران (۲۰۰۵) و Zhang و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از نشانگرهای SSR به ترتیب نقشه ژنتیکی *T. repens* و *T. pratense* را تهیه نمودند. همچنین، تنوع ژنتیکی در *T. pratense* با استفاده از صفات ریخت‌شناختی و نشانگرهای SSR (Dias et al., 2008) و در *T. repens* بر پایه صفات ریخت‌شناختی، نشانگرهای SSR و RAPD (Zhang, 2010) ارزیابی شده است. بررسی منابع نشان می‌دهد که تاکنون تحقیقاتی در زمینه جداسازی، شناسایی و تعیین ردیف بازی توالی‌های تکراری ساده گونه‌های *T. resupinatum* و *T. fragiferum* انجام نشده است. به منظور رفع کمبود اطلاعات موجود در این زمینه می‌توان اقدام به جداسازی و توالی‌یابی این جایگاه‌های ژنی کرد و یا نسبت به بررسی انتقال‌پذیری آغازگرهای توالی‌های تکراری ساده (SSR) به دست آمده از گونه‌های خویشاوند در این گونه‌ها پرداخت. در این پژوهش، با توجه به کم هزینه‌تر بودن، سادگی و سرعت روش اخیر و همچنین تعدد مکان‌های توالی‌های تکراری ساده شناخته شده در دو گونه *T. pratense* و *T. repens*، انتقال‌پذیری آغازگرهای این دو گونه به ژنوتیپ‌های *T. resupinatum* و *T. fragiferum* به منظور بررسی میزان شباهت ژنتیکی این دو گونه ارزیابی شد و ریزماهوره‌های تکثیر شده به عنوان

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های جمعیتی مطالعه شده از گونه‌های *T. fragiferum* و *T. resupinatum* = HUI در باغ‌ریوم دانشگاه اصفهان

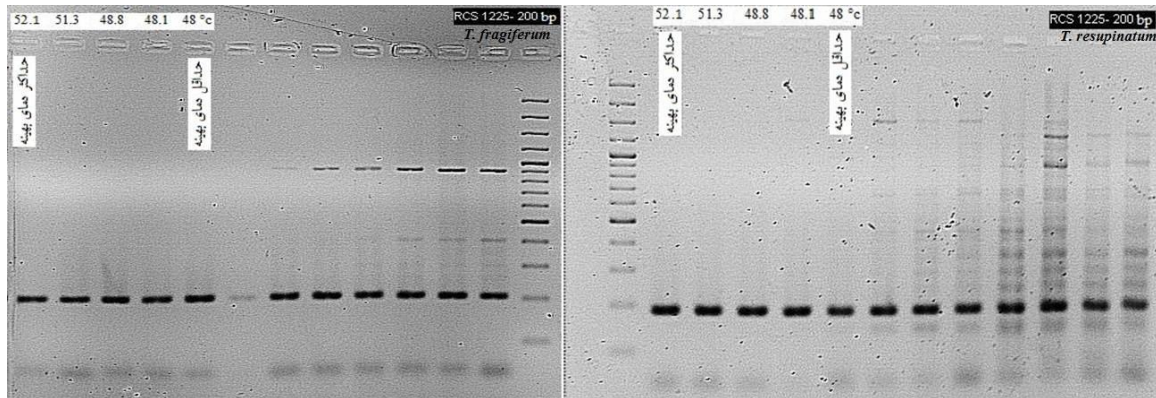
تاکسون	کد تاکسون	شماره هر با ریومی	تاریخ جمع آوری	ارتفاع از سطح دریا (متر)	محل جمع آوری
<i>T. fragiferum</i> var. <i>fragiferum</i>	Tff1	17836 HUI	۱۳۸۹/۰۴/۳۱	۲۱۰۸	تهران: فیروزکوه به پلور، ارجمند
	Tff2	17835 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۲۹	۰	گلستان: گلوگاه به گرگان، روستای النگ
	Tff3	17838 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۱۴	۱۲۵۰	آذربایجان غربی: ۲۰ کیلومتری اهر به مشکین شهر، روستای نقاره کوب
	Tff 4	17847 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۰۱	۱۹۲۹	لرستان: شول آباد
<i>T. fragiferum</i> var. <i>pulchellum</i>	Tfp1	17830 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۱۴	۱۲۵۰	آذربایجان غربی: ۲۰ کیلومتری اهر به مشکین شهر، روستای نقاره کوب
	Tfp2	17833 HUI	۱۳۸۹/۰۴/۲۹	۰	مازندران: بهمنیر به قائم شهر
	Tfp3	17834 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۱۲	۱۳۰۰	کردستان: ۶۰ کیلومتری پیرانشهر از سردشت، نرسیده به موسالان
	Tfp4	17839 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۱۴	۱۷۷۰	آذربایجان غربی: دامنه سبلان، ۸ کیلومتری آبگرم قینرجه و موئیل
<i>T. resupinatum</i> var. <i>resupinatum</i>	Trr1	17895 HUI	۱۳۸۸/۰۲/۲۵	۱۱۰	خوزستان: ۵ کیلومتری جاده اندیمشک به شوش
	Trr2	17897 HUI	۱۳۸۸/۰۳/۰۸	۱۳۰۳	گلستان: علی آباد، سه راه کبودوال
	Trr3	17901 HUI	۱۳۸۹/۰۳/۲۱	۷۹	گیلان: ۱۷ کیلومتری رشت از قزوین - روستای جو کلبدان
<i>T. resupinatum</i> var. <i>microcephalum</i>	Trmi1	17893 HUI	۱۳۸۸/۰۲/۲۵	۹۴	خوزستان: ۲۰ کیلومتری جاده اندیمشک به شوش
	Trmi2	17892 HUI	۱۳۸۸/۰۳/۱۱	۳۳۰	مازندران: زیر آب به فیروزکوه، ۴ کیلومتری زیر آب
	Trmi3	17894 HUI	۱۳۸۹/۰۳/۲۵	۴۳	گیلان: رضوانشهر
<i>T. resupinatum</i> var. <i>majus</i>	Trma5	17903 HUI	۱۳۸۸/۰۲/۲۷	۸۲۸	خوزستان: ۵ کیلومتر جاده ایذه به دهدز
	Trma1	17887 HUI	۱۳۸۸/۰۳/۰۸	۲۰۰	گلستان: علی آباد به آزادشهر، ابتدای جاده زرین گل
	Trma2	17890 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۰۲	۱۴۸۸	لرستان: درود
	Trma3	17886 HUI	۱۳۸۸/۰۲/۲۵	۸۷۹	لرستان: بعد از پل دختر - بین تنگ فنی و روستای ولیعصر
	Trma4	17883 HUI	۱۳۸۹/۰۱/۲۷	۴۲۴	خوزستان: باغ ملک به رامهرمز، بعد از رود زرد

جداگانه توسط PCR گرادیان تعیین شد و سپس با بررسی محصول PCR بهترین غلظت و مناسب ترین دما انتخاب گردید. محدوده گرادیان دمایی حداکثر بین ± 8 درجه سانتیگراد پایین ترین دمای ذوب توصیه شده برای هر زوج آغازگر در نظر گرفته شد. برای هر زوج آغازگر یک محدوده دمایی بهینه از حداقل تا حداکثر

به منظور بهینه سازی، یعنی تعیین غلظت های مناسب مواد واکنش و دمای مناسب اتصال آغازگرها (T_a , annealing temperature) جهت به دست آوردن محصول PCR مناسب، غلظت اجزای واکنش PCR (یون منیزیم، غلظت DNA و آغازگرها) و نیز دمای اتصال در شرایط مختلف برای هر یک از آغازگرها

نبودند و یا نتوانستند قطعات DNA را تکثیر کنند. به همین دلیل نشدند (جدول ۲). ۹ زوج آغازگر که در PCR گرایان دارای محصول PCR مشخص بودند انتخاب و فرآیند PCR پس از تعیین دمای مناسب برای آنها انجام شد.

دمای بهینه تعیین گردید (شکل ۱)، به طوری که در بردارنده دمای بهینه اتصال برای هر دو گونه باشد. بنابراین، فرآیند PCR برای هر دو گونه به طور هم‌زمان انجام شد. از ۲۲ زوج آغازگر SSR استفاده شده، ۱۳ زوج از آنها دارای محصول PCR مشخص و منفرد



شکل ۱- تعیین دمای بهینه اتصال زوج آغازگر RCS-1225 بر روی ژنوم *T. fragiferum* و *T. resupinatum*

جدول ۲- توالی ۲۲ زوج آغازگر نشانگرهای SSR آزموده شده در ۱۹ جمعیت از گونه‌های *T. fragiferum* و *T. resupinatum* * آغازگرهایی که توانستند در این مطالعه ریزماهوره‌های مورد نظر را تکثیر کنند.

نام آغازگر	ردیف قطعه تکراری (motif)	توالی آغازگر پیرو (۵' → ۳')	توالی آغازگر پیشرو (۵' → ۳')
RCS0883 *	AAG	GAAGAGATAGCTTGCTTGGA	CACGTTACTCAATTTGGATCTTTG
RCS0907	AAC	TGGGGAAGTGAAGGATGTTC	ATTTGAGCACAAGGCCTCAC
RCS1479	AG	ATCAACTCGATGGGAACACC	TTTTCTGGCGACGAATTAGG
RCS2773	AAG	GATTCGATCCTCCTCCTCC	AATAACAATATGCGGCTTTGC
RCS0033	AAT	GCAGATTATGAGGAATAACATTG	AAATTATCATTGCAAATTTTA
RCS2343	AC	TTCAATCGGGAGTGTCAAGT	CGATTGCTACAAACACAGCC
RCS1735 *	AAC	GGTGCTAGCTCCAACCTCAG	CCTGCTCCGTACCATTGTTT
RCS2667 *	AAG	GGTGGTGTGCTGATTACGA	CCTCAGCAGAATCTTCACCC
RCS1920*	AAG	CCCCAAAATACAAAACCTT	GAGAAAAGAAAGAAGTCTCTGAAGGA
RCS1928 *	AGC	CCTTTCAGAACAGATGGCGT	TACCTCTTGAGCACCCATT
RCS2202 *	AC	CGGCAGACGAAGTGACAAAT	GCCGATATTGCTAGGTTGGA
RCS1225 *	ATC	CTCGCTGAAGGAGGAAACAG	TGCAAACCTCCGCTTTATGC
RCS1737	ATC	AGCTCAAGCTCAACGGACAT	GGCACGAGGCACACTACTTC
RCS1518	ATC	CGAAGCAGGTTGGAAAACAT	GCACGAGGCACACACTACTT
RCS0843	GGAT	TTGGCATCTCAAAGCTGAAA	GCCAAGCCACCAATACATA
RCS3666 *	AC	TCTGTTTCTTGCTCGGCCT	CATGGCTGCCTGAGGTTAAT
RCS3052	AAC	CACTAATTCAGACCACCAGCA	TCGGTGAGCTGTGACTAACG
RCS1327	ATC	AAACAAACCAAGCAGCACCT	ACGGTGGAATTATGGGATGA
RCS0793	AAG	TTCAACATGCAGGCTAAGAAAA	CGCAATCTTCTTCTCATTCA
RCS1897 *	AAAG	ATGAGCACCTTACCAATCC	CATGTCAGCATATCCATTTTCC
TRSSRATS054	-----	AATCACGACGAGCGACAACA	GACACCGATTATGTGCAAGA
TRSSRATS055	-----	TCTCTGCTTCGCGTCTTCTC	CAATACAATCACCGCACCAG

گروه‌بندی‌ها در دندروگرام‌های حاصل از این ضرایب مشاهده نشد. رسته‌بندی توده‌ها نیز با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اول و دوم (PCA, Principle Coordinate Analysis) به وسیله نرم‌افزار GenAlex6 انجام شد.

بحث و نتیجه‌گیری

از میان ۲۲ جفت آغازگر مورد آزمایش، ۹ جفت توانستند ۴۶ آلل در جمعیت‌های گونه *T. fragiferum* و ۵۶ آلل در جمعیت‌های گونه *T. resupinatum* تکثیر کنند (جدول ۳) که بسیاری از این آلل‌ها بین دو گونه مشترک هستند. این نتیجه می‌تواند بیانگر شباهت زیاد ژنوم این دو گونه باشد.

از میان این آغازگرها، زوج آغازگر RCS1928 که قطعاتی از DNA گونه‌های *T. fragiferum* و *T. resupinatum* را تکثیر نمود، چه در درون گونه‌ها و چه در بین دو گونه، تنوعی نشان نداد (شکل‌های ۲ و ۳) که نشان می‌دهد این ریزماهواره در بخش‌هایی از ژنوم واقع شده است که در طول تکامل، توالی‌های خود را به شدت حفظ نموده است. زوج آغازگر RCS3666 در درون هر دو گونه تنوعی نشان نداد، ولی در بین دو گونه قطعات متفاوتی را تکثیر کرد که گویای وجود تفاوت ژنومی در این ناحیه از DNA دو گونه است (شکل‌های ۲ و ۳). زوج آغازگرهای RCS1920 و RCS1897 با این که در گونه *T. fragiferum* تنوعی نشان ندادند (شکل ۲)، ولی در گونه *T. resupinatum* به خوبی چندشکلی را آشکار ساختند (شکل ۳). بنابراین، می‌توان چنین نتیجه گرفت که نقاطی از ژنوم که در بردارنده این ریزماهواره‌هاست در گونه *T. fragiferum* در نواحی حفاظت شده واقع شده، در حالی که در گونه *T. resupinatum* در مسیر تکامل

به طور خلاصه، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲۵۰ نانومول از هر آغازگر، مخلوط dNTP با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار، کلرید منیزیم با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، ۱/۲ واحد آنزیم *Taq polymerase* و ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی از نمونه‌های مطالعه شده، انجام شد. برنامه PCR به این ترتیب بود: ۹۴ درجه سانتیگراد ۴ دقیقه؛ ۲۰ دور با ۹۴ سانتیگراد ۱ دقیقه، ۱ دقیقه در حداکثر دمای اتصال بهینه، ۷۲ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه؛ ۱۵ دور با ۹۴ سانتیگراد ۱ دقیقه، ۱ دقیقه در حداقل دمای اتصال بهینه، ۷۲ سانتیگراد ۱ دقیقه؛ در پایان، ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه.

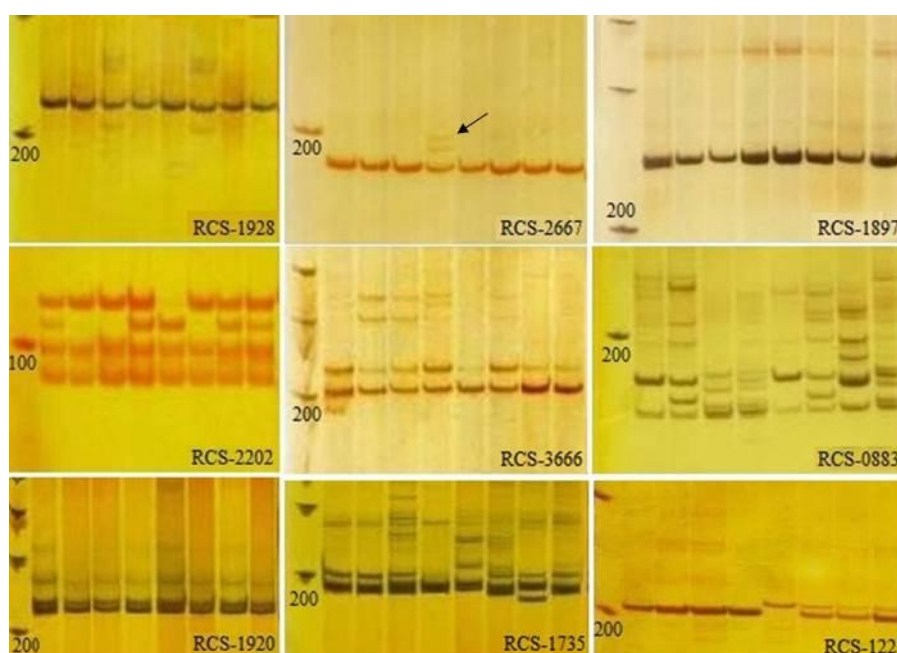
تفکیک باندهای حاصل ابتدا روی ژل آگاروز ۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید با ولتاژ ۱۰۰ ولت انجام شد و تهیه عکس با استفاده از دستگاه UV transiluminator صورت گرفت. برای تفکیک دقیق‌تر باندها از روش الکتروفورز عمودی با ژل پلی‌آکریل آمید ۱۲ درصد استفاده شد. رنگ آمیزی ژل پلی‌آکریل آمید با نیترات نقره و ظهور باندها به وسیله هیدروکسید سدیم انجام شد. تحلیل باندها با در نظر گرفتن هر شماره باند به عنوان یک صفت انجام گرفت. در ارزیابی تاکسونومی عددی هر باند با دو حالت وجود (۱)/غیاب (۰) ارزیابی شد. دندروگرام با استفاده از ضریب Dice، Jaccard (J) و Simple Matching (SM) ترسیم شد. به منظور سنجش میزان انطباق دندروگرام رسم شده با ماتریس تشابه، میزان همبستگی کوفنتیک برای هر کدام از ضرایب فوق، محاسبه شد. دندروگرام رسم شده با نرم‌افزار NTSYS_{pc} 2 بر اساس ضریب جاکارد، بیشترین میزان همبستگی ($r = 0.73$) را نشان داد. بنابراین، از این ضریب برای رسم دندروگرام به روش UPGMA استفاده شد. البته تفاوت‌های معنی‌داری در

جمعیت‌های این گونه (Tff4)، دو آللی را که این آغازگر تنها برای گونه *T. resupinatum* تکثیر کرده بود، نشان داد که می‌تواند بیانگر ردپایی از نفوذ گذشته باشد (شکل ۲، باندهای مربوط روی تصویر با پیکان نشان داده شده است).

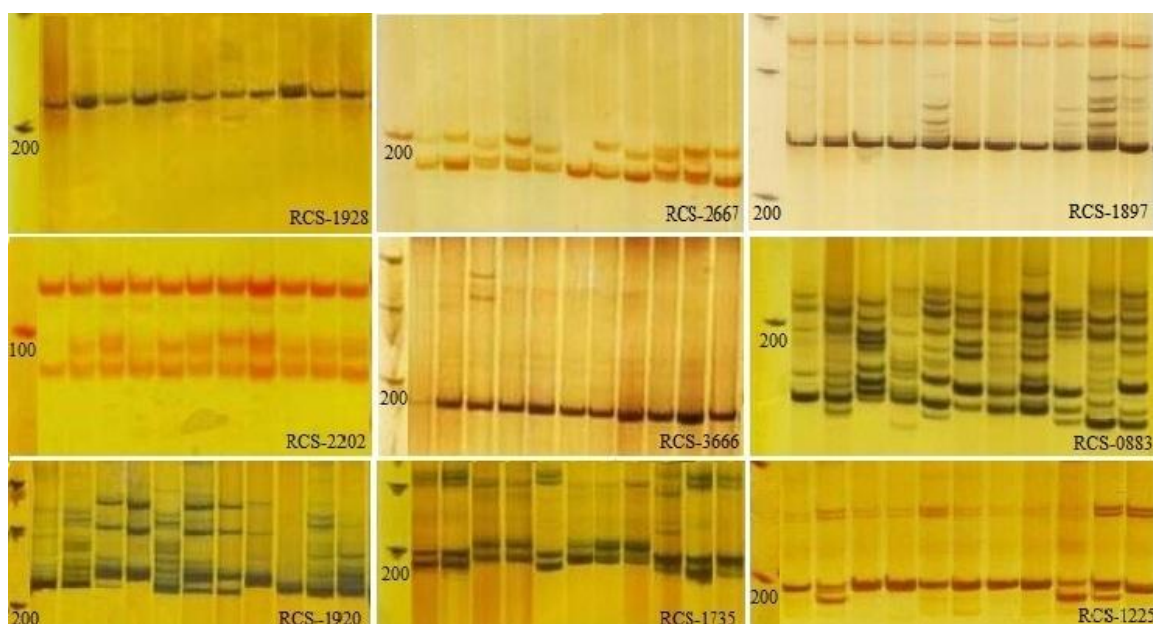
دستخوش تغییراتی شده است. به بیان دیگر، این ریزماهورها در بخش‌هایی از DNA واقع شده‌اند که در بین دو گونه از حیث ساختار و عملکرد متفاوت هستند. زوج آغازگر RCS2667 در گونه *T. fragiferum* تنوعی نشان نداد، اما یکی از

جدول ۳- مقایسه نتایج حاصل از تکثیر ۹ نشانگر SSR در ۱۹ جمعیت از گونه‌های *T. fragiferum* و *T. resupinatum*

ردیف	نام آغازگر	محدوده دمای اتصال بهینه (درجه سانتیگراد)	شبدر توت‌فرنگی (<i>T. fragiferum</i>)		شبدر ایرانی (<i>T. resupinatum</i>)	
			اندازه قطعات (bp)	تعداد آلل‌ها	اندازه قطعات (bp)	تعداد آلل‌ها
۱	RCS0883	۴۷-۵۵	۱۵۰-۲۳۰	۱۱	۱۵۰-۲۳۰	۱۲
۲	RCS1225	۴۸-۵۲	۱۹۰-۲۵۰	۵	۱۹۰-۲۵۰	۵
۳	RCS1735	۴۶-۵۲	۱۸۰-۳۱۰	۱۱	۱۸۰-۳۱۰	۸
۴	RCS1920	۴۶-۵۲	۲۲۰-۳۱۰	۴	۲۲۰-۳۶۰	۱۱
۵	RCS1928	۵۰-۵۸	۲۰۵-۲۵۰	۴	۲۰۵-۲۵۰	۴
۶	RCS2667	۴۸-۵۲	۱۹۰-۲۰۰	۳	۱۹۰-۲۰۰	۴
۷	RCS3666	۴۸-۵۲	۲۰۰-۲۳۰	۲	۱۹۰	۱
۸	RCS2202	۴۸-۵۱	۹۰-۱۲۰	۴	۹۰-۱۲۰	۵
۹	RCS1897	۴۸-۵۲	۲۴۰-۲۶۰	۲	۲۴۰-۲۹۵	۶
				= ۴۶		= ۵۶



شکل ۲- الگوی چندشکلی حاصل از تکثیر ۹ نشانگر SSR در ۸ جمعیت از گونه *T. fragiferum*



شکل ۳- الگوی چندشکلی حاصل از تکثیر ۹ نشانگر SSR در ۱۱ جمعیت از گونه *T. resupinatum*

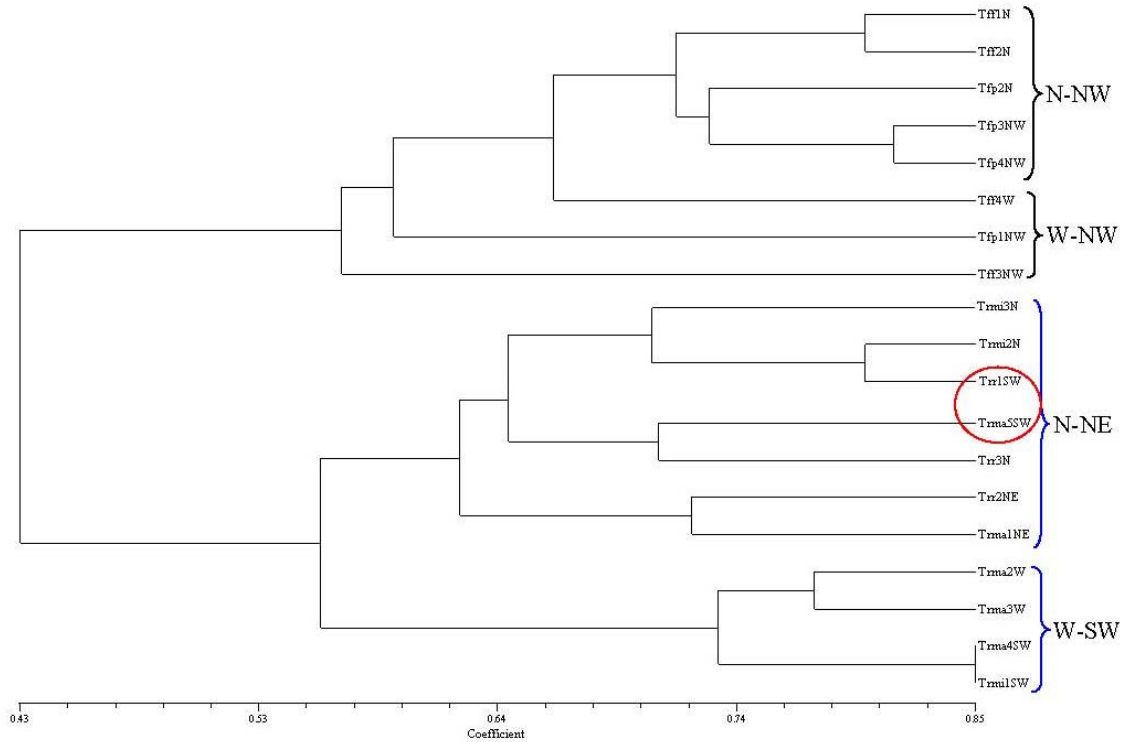
همان طور که دندروگرام (شکل ۴) نشان می‌دهد، گونه *T. fragiferum* از نظر جغرافیایی دو گروه همپوشان را تشکیل داد: خزانه ژنی شمال-شمال غرب و خزانه ژنی غرب-شمال غرب، که این دو خزانه ژنی در ناحیه شمال غرب همپوشانی دارند. به نظر می‌رسد که این گونه از شمال غرب ایران و به احتمال زیاد از کشور ترکیه وارد ایران شده، در دو مسیر متفاوت، به سمت شمال و غرب در امتداد رشته کوه‌های البرز و زاگرس پراکنش یافته است. پراکنش این گونه در امتداد ساحل دریاچه شور ارومیه، مؤید قابلیت بالای این گونه در سازش با محیط‌های پر تنش به ویژه خاک‌های شور و قلیایی است. در گونه *T. resupinatum* دو گروه جغرافیایی مجزا شامل خزانه ژنی شمال-شمال شرق و غرب-جنوب غرب مشاهده شد. این گروه‌بندی، منطبق با پراکنش جغرافیایی ناشی از سازگاری این گونه با محیط است. البته آثاری از نفوذ خزانه ژنی غرب-جنوب غرب در خزانه ژنی شمال-شمال شرق نیز مشاهده می‌گردد که

سایر آغازگرها در هر دو گونه تنوع در خور ملاحظه‌ای نشان دادند. همان طور که در دندروگرام حاصل از تحلیل باندها (شکل ۴) مشاهده می‌شود، در بیشتر موارد، میزان شباهت بین جمعیت‌ها اندک است. با توجه به سیستم زادآوری در این دو گونه که اغلب از نوع خودلقاحی (autogamy) است (Taylor and Gillett, 1988)، انتظار می‌رود که کم بودن جریان ژنی بین جمعیت‌ها سبب افزایش تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و به همان نسبت کاهش تنوع در درون جمعیت‌ها شود که دندروگرام حاصل از این تحقیق به روشنی این مطلب را نشان داد.

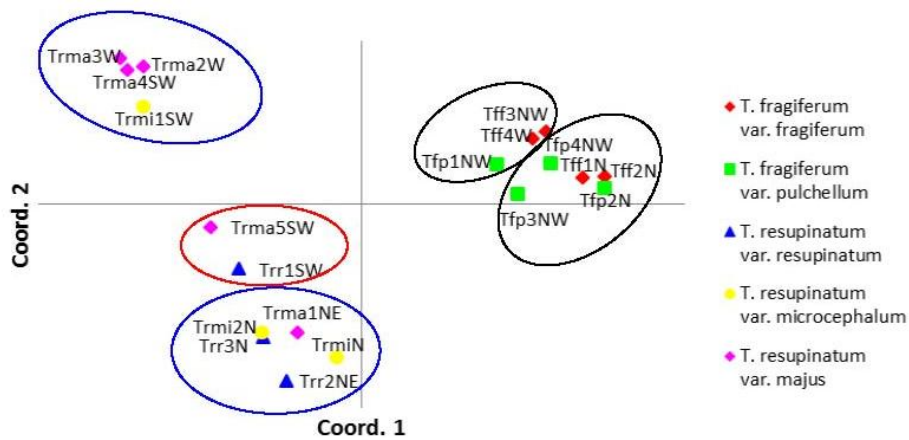
در دندروگرام حاصل از نشانگرهای SSR، دو گونه *T. resupinatum* و *T. fragiferum* در سطح ۴۳ درصد کاملاً از هم جدا شدند و جمعیت‌های مربوط به هر گونه بر روی یک خوشه مجزا قرار گرفتند (شکل ۴) که این گروه‌بندی با طبقه‌بندی تاکسونومیک این گونه‌ها مطابقت دارد (Zohary and Heller, 1984).

دندروگرام حاصل از نشانگرهای SSR سطوح فرگونه‌ای (واریت‌ها) را به وضوح از هم جدا نکرد و این نشان می‌دهد که این نشانگر در جنس *Trifolium* در سطوح فرگونه‌ای کارآیی چندانی ندارد (شکل ۴).

با توجه به فاصله مکانی بین این خزانه‌های ژنی، به احتمال زیاد این اختلاط ناشی از دخالت انسان به واسطه انتقال بذر باشد. این نتایج را در آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA) نیز به وضوح می‌توان مشاهده کرد (شکل ۵).



شکل ۴- دندروگرام UPGMA بر مبنای میزان شباهت‌های حاصل از تحلیل داده‌های SSR با استفاده از ضریب جاکارد (J) در میان ۱۹ جمعیت از گونه‌های *T. fragiferum* و *T. resupinatum*. N = شمال، NE = شمال شرق، NW = شمال غرب، W = غرب و SW = جنوب غرب. جمعیت‌هایی که توسط دایره احاطه شده‌اند نفوذی‌های خزانه ژنی غرب-جنوب غرب در خزانه ژنی شمال-شمال شرق در گونه *T. resupinatum* هستند.



شکل ۵- رسته‌بندی ۱۹ جمعیت از گونه‌های *T. resupinatum* و *T. fragiferum* بر اساس دو مؤلفه اصلی اول (PCA) بر مبنای میزان شباهت‌های حاصل از تحلیل داده‌های SSR. N = شمال، NE = شمال شرق، NW = شمال غرب، W = غرب و SW = جنوب غرب.

طراحی نشده است، می‌توان با ضریب اطمینان بالایی از آغازگرهای SSR به دست آمده از *T. pratense* و *T. repens* برای بررسی تنوع ژنتیکی آنها استفاده نمود.

از طرفی، به دلیل این که در این پژوهش استخراج DNA ژنومی به صورت جمعیتی انجام گرفت، امکان محاسبه تنوع درون جمعیتی و برون جمعیتی و مقایسه آنها به صورت عددی وجود نداشت. لذا، با توجه به اهمیت این دو گونه زراعی و مرتعی مطالعه دقیق‌تر تنوعات درون و برون جمعیتی در این دو گونه با استفاده از نشانگر SSR و یا سایر نشانگرهای مولکولی پیشنهاد می‌گردد.

نتایج حاصل از این مطالعه، حاکی از سطح بالای چندشکلی و انتقال پذیری ریزماهوره‌های معرفی شده برای *T. pratense* و *T. repens* به گونه‌های *T. fragiferum* و *T. resupinatum* است. بالا بودن انتقال پذیری نشان می‌دهد که این گونه‌ها از نظر ژنتیکی به هم نزدیک هستند و پس از جدایی، ژنوم آنها تغییرات زیادی را متحمل نشده‌اند. بنابراین، می‌توان از نشانگرهای مولکولی SSR مربوط به گونه‌های نزدیک به یکدیگر برای ارزیابی و تحلیل ژنوم در گونه‌های مختلف این جنس استفاده نمود. بر این اساس، تا زمانی که جفت آغازگرهای SSR اختصاصی برای *T. fragiferum* و *T. resupinatum*

منابع

- جود، وی. اس.، کمپبل، سی. اس.، کلوگ، ای. ای. و استیونس، پی. اف. (۱۳۸۲) سیستماتیک گیاهی. ترجمه سعیدی، ح. الف، انتشارات جهاد دانشگاهی، واحد صنعتی اصفهان، اصفهان.
- زمانیان، م. (۱۳۸۴) بررسی اثر فصل کاشت بر تولید علوفه گونه‌های شبدر. نهال و بذر ۲۱: ۱۵۹-۱۷۳.
- عباسی، م. ر. (۱۳۸۷) بررسی تنوع در خزانه‌های ژنتیکی شبدر ایرانی (*T. resupinatum*) موجود در بانک ژن گیاهی ملی ایران. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۱۶(۱): ۳۷-۴۹.
- عباسی، م. ر. و زمانیان، م. (۱۳۸۴) بررسی پتانسیل تولید، صفات مهم در عملکرد و گروه‌بندی ژرم‌پلاسم شبدرهای ایرانی چند چین. اولین همایش ملی گیاهان علوفه‌ای کشور، کرج.
- نقوی، م.، قره یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق. (۱۳۸۴) نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران، تهران.
- Dias, P. M. B., Julier, B. Sampaoux, J. P., Barre, P. and Dall'Agnol, M. (2008) Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers. *Euphytica* 160: 189-205.
- Ellison, N. W., Liston, A., Steiner, J. J., Williams, W. M. and Taylor, N. L. (2006) Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium*-Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 688-705.
- Fehr, W. R. (1987) Principles of cultivar development. vol. 1. Theory and technique. McGraw Hill, New York.
- Heller, D. (1984) *Trifolium*. In: Flora Iranica. (ed. Rechinger, K. H.) 157: 275-325. Akademische Druck-u., Verlagsanstalt, Graz.
- Lefort, F. and Douglas, G. C. (1999) An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves

- of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Annales of Forest Science* 56: 259-263.
- Sato, S., Isobe, S., Asamizu, E., Ohmido, N., Nakamura, Y., Kaneko, T., Sakurai, N., Okumura, K., Klimenko, I., Sasamoto, S., Wada, T., Watanabe, A., Kohara, M., Fujishiro, T. and Tabata S. (2005) Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pratense* L.). *DNA Research* 12: 301-364.
- Taylor, N. L. (1985) *Clover science and technology*. Madison, Wisconsin.
- Taylor, N. L. and Gillett, J. M. (1988) Crossing and morphological relationships among *Trifolium* species closely related to strawberry and Persian clover. *Crop Science* 28: 636-639.
- Zhang, X., Zhang, Y., Yan R., Han, J., Hong, F., Wang, J. and Cao, K. (2010) Genetic variation of white clover (*Trifolium repens* L.) collections from China detected by morphological traits, RAPD and SSR. *African Journal of Biotechnology* 9(21): 3032-3041.
- Zhang, Y., Sledge, M. K. and Bouton, J. H. (2007) Genome mapping of white clover (*Trifolium repens* L.) and comparative analysis within the Trifolieae using cross-species SSR markers. *Theor Appl Genet.* 114: 1367–1378.
- Zohary, M. and Heller, D. (1984) *The genus Trifolium*. The Israel Academy of Science, Jerusalem.

مطالعه تبارشناسی داده‌های ریخت‌شناختی و ارزیابی روند تکاملی این صفات در جنس کمای (*Ferula L.*) ایران

محمد رضا کنعانی^{۱*}، محمدرضا رحیمی‌نژاد رنجبر^۲، شاهرخ کاظم‌پور اصلو^۳ و ولی‌اله مظفریان^۴
^۱ گروه زیست‌شناسی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
^۳ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
^۴ بخش گیاه‌شناسی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها مراتع کشور، تهران، ایران

چکیده

جنس کمای (*Ferula L.*) متعلق به تیره چتریان (Apiaceae)، قبیله Scandiceae شامل حدود ۱۷۰-۱۸۷ گونه است. در این مطالعه، وضعیت فیلوژنی این جنس در ایران و در مفهوم وسیع با استفاده از تحلیل کلادیستیک (تبارشناسی) داده‌های ریخت‌شناختی کدبندی شده و به روش تحلیل امساک (Maximum Parsimony) و با استفاده از نرم‌افزار *Win-PAUP نسخه 4.0b10 بررسی شد. به علاوه، روند تکاملی ۳۳ صفت ریخت‌شناختی این جنس با استفاده از برنامه MacClade 3.01 Macintosh OS مطالعه شد. نتایج ما تک نیایی بودن جنس کمای ایران را نشان داد. مقایسه و ارزیابی درخت اجماع داده‌های مولکولی و ریخت‌شناختی نشان داد که دو گونه از جنس *Leutea* در ایران بایستی به جنس کمای منتقل گردند و بر این اساس دو ترکیب جدید به گونه‌های کمای ایران اضافه شد. اگر چه جنس *Dorema* نیز در شاخه کمای قرار گرفت اما انتقال قطعی آن نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. همچنین، دو ترکیب جدید *Ferula avicennia* (Mozaff.) Kanani و *Ferula nematoloba* (Rech. f.) Kanani به گونه‌های کمای ایران اضافه شد.

واژه‌های کلیدی: ایران، چتریان، ریخت‌شناختی، کلادیستیک، کمای (*Ferula L.*)

مقدمه

داده‌های پایه‌ای موجود از مرکز نام‌گذاری جنس‌ها (Generic nomenclator) تیره چتریان شامل ۴۶۴ جنس پذیرفته شده است (Pimenov and Leonov, 2004). عرصه رویش عمده گونه‌های این تیره مناطق مدیترانه‌ای،

تیره چتریان (Apiaceae) با حدود ۴۲۵۰ گونه در جهان، از تیره‌های بزرگ گیاهی با پراکنش گسترده محسوب می‌شود (Judd et al., 2007). بر اساس آخرین

زیرقبیله *Ferulinae* Drude قرار داد. پس از او، بیشترین توصیف طبقه‌بندی در سطح زیرجنس *Ferula* مربوط به Korovin (۱۹۳۹، ۱۹۴۰، ۱۹۴۷، ۱۹۵۱، ۱۹۵۹) است. وی با کم اهمیت دانستن صفات میوه و توجه بیشتر به برگ و گل، ۶ زیرجنس و ۸ بخش را در فلور روسیه پیشنهاد کرد (Korovin, 1951).

Safina و Pimenov (۱۹۸۴، ۱۹۹۰) در بازنگری فلور قزاقستان، با تأکید بر صفات میوه، ۹ تیپ اصلی میوه را ارائه و زیرجنس‌های Korovin را مردود و ۱۲ بخش را پیشنهاد کردند. Chamberlain و Rechinger (۱۹۸۷) در فلورا ایرانیکا تنها زیرجنس‌های Korovin (۱۹۵۹) را به کار برد.

امروزه بسیاری از اعضا *Peucedaneae* در مفهوم وسیع، در قبیله *Seselineae* Koch قرار گرفته‌اند (Downie *et al.*, 1996a, 1996b, 1998, 2000a, Spalik؛ Katz-Downie *et al.*, 1999؛ 2000c, 2002 *et al.*, 2004). با وجود یکنواختی نسبی بین جنس‌های قبیله *Peucedaneae* در مطالعه ایمنی‌شناختی، گونه‌های *Ferula* از سایر اعضا *Peucedaneae* یعنی *Azilia*، *Demavendia*، *Cymbocarpum*، *Cervaria*، *Galagania*، *Ferulago*، *Dorema*، *Diplotaenia*، *Laser*، *Kelussia*، *Johrenia*، *Hausknechtia*، *Pastinaca*، *Opsiocarpum*، *Opopanax*، *Leutea*، *Peucedanum* و *Schumannia* جدا افتادند (Shneyer *et al.*, 1995). اخیراً مطالعات ردیف‌خوانی مولکولی با استفاده از نشانگر ITS (internal transcribed spacer) نشان داده است که جنس *Peucedaneae* به عنوان جنسی تک‌نیا در زیرشاخه *Apioid*، قبیله *Scandiceae* و زیرقبیله *Ferulinae* قرار می‌گیرد (Spalik *et al.*, 2001a, 2001b, 2004

ترکیه، ایران و ترکمنستان است (قهرمان، ۱۳۷۲). کشور ایران به همراه چین و ترکیه، از نظر این تیره، یکی از مناطق بسیار غنی و متنوع است و احتمالاً خاستگاه بسیاری از جنس‌ها و زیر تقسیمات آن محسوب می‌شود (Valiejo-Roman *et al.*, 2006). بر اساس داده‌های پایه‌ای چتریان موجود در باغ گیاه‌شناسی دانشگاه مسکو (*Asian Umbelliferae: ASIUM*)، حدود ۱۱۴ جنس و ۳۶۳ گونه از این تیره در ایران می‌روید که ۱۲ جنس و ۱۱۴ گونه از ۴۶ جنس آن انحصاری ایران است (Pimenov and Leonov, 2004). از زمان *Plantarum Umbelliferarum* (۱۶۷۲) در کتاب ریخت‌شناسی و تشریح میوه به‌عنوان ضرورت اصلی در رده‌بندی این تیره محسوب می‌شده است و با وجود شباهت کلی اعضا، تنوع اشکال میوه‌ها به‌عنوان صفت متمایز کننده‌ای به کار بسته شده است (Downie *et al.*, 2000b).

جنس *Ferula* L. با نام‌های فارسی کما، باریجه و آنغوزه (مظفریان، ۱۳۸۶) شامل ۱۷۰-۱۸۵ گونه (Pimenov and Leonov, 1993؛ Kurzyina-Mlynik *et al.*, 2008) از آسیای مرکزی به سمت غرب در سراسر منطقه مدیترانه‌ای و تا آفریقای شمالی گسترده شده است. این جنس به‌عنوان بزرگ‌ترین عضو چتریان در آسیا (۱۷۷) و سومین جنس این تیره در دنیا محسوب می‌شود (Pimenov and Leonov, 2004). در ایران، ۳۲ (مظفریان، ۱۳۸۶)، ترکیه ۱۷ (Pesmen, 1972)، چین ۲۶ (Ke, 2005)، پاکستان ۱۵ (Nasir, 1972)، عراق ۵ (Chamberlain and Rechinger, 1987) افغانستان ۲۹ و در روسیه ۴۱ گونه (Shishkin, 1951) وجود دارد. سنتی‌ترین طبقه‌بندی این جنس متعلق به Drude (۱۸۹۸) است که جنس کما را در قبیله *Peucedaneae* DC.

رویشی و زایشی آنها بوده است. در طبقه‌بندی گونه‌های کمای، عمده‌ترین صفات استفاده شده در تفکیک گونه‌ها، صفات ریخت‌شناختی مربوط به مریکارب‌ها، لوب‌های برگ، گل آذین، رنگ گل، حالات مختلف غلاف‌برگی و همچنین وجود و عدم وجود گُرک روی اندام‌های مختلف بوده است (Drude, 1898; Korovin, 1947; Safina and Pimenov, 1984; Pimenov and Leonov, 1993). در این تحقیق نیز همین صفات انتخاب و ارزیابی شد. ثبت و بررسی صفات ریخت‌شناختی، از روی نمونه‌های جمع‌آوری شده و در برخی موارد که جمع‌آوری مقدور نبود، با استفاده از توصیف‌های ریخت‌شناختی مشروح در منوگراف این جنس و فلورهای همجوار با ایران انجام گرفت. در مجموع، ۳۳ صفت کمی (۱۸ صفت) و کیفی (۱۵ صفت) با حالت‌های مختلف عددی کدبندی شده به شکل غیررتبه‌بندی شده برای ۴۳ تاکسون جهت بررسی تحلیل کلادیستیک ریخت‌شناختی استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۱- فهرست گونه‌های کمای ایران بررسی شده در مفهوم وسیع به همراه برون‌گروه

نام گونه	نام گونه
<i>Ferula alliaceae</i> Boiss.	<i>F. oopoda</i> (Boiss. & Buhse) Boiss.
<i>F. assa-foetida</i> L.	<i>F. orientalis</i> Boiss.
<i>F. behboudiana</i> (Rech. f. & Esfand.) Chamberlain	<i>F. ovina</i> (Boiss.) Boiss.
<i>F. cupularis</i> (Boiss.) Spalik et S. R. Downie	<i>F. petiolaris</i> DC.
<i>F. diversivittata</i> Regel & Schmalh.	<i>F. persica</i> Willd var. <i>latisecta</i> Chamberlain
<i>F. elbursensis</i> (Mozaff.) Spalik et S. R. Downie	<i>F. persica</i> Willd. var. <i>persica</i>
<i>F. flabelliloba</i> Rech. f. & Aell.	<i>F. pseudalliacea</i> Rech.f.
<i>F. foetida</i> (Bunge) Regel	<i>F. rigidula</i> DC.
<i>F. gabrielli</i> Rech.f.	<i>F. serpentinea</i> Rech.f.
<i>F. galbaniflua</i> Boiss. & Buhse	<i>F. sharifii</i> Rech.f. & Esfand.
<i>F. gummosa</i> Boiss.	<i>F. sphenobasis</i> C. C. Townsend
<i>F. haussknechtii</i> Wolff & Rech.f.	<i>F. stenocarpa</i> Boiss. & Hausskn.
<i>F. hezarlahzarica</i> Y. Ajani	<i>F. szowitziana</i> DC.
<i>F. hirtella</i> Boiss.	<i>F. tabasensis</i> Rech.f.
<i>F. karakalensis</i> Korov.	<i>F. xylorhachis</i> Rech.f.
<i>F. kashanica</i> Rech.f.	<i>Leutea avicennia</i> Mozaff.
<i>F. kokanica</i> Regel & Schmalh.	<i>L. nematoloba</i> (Rech.f.) M. Pimen.
<i>F. laseroides</i> (Akhani) Spalik et S. R. Downie	<i>Laser trilobum</i> (L.) Borkh.
<i>F. latisecta</i> Rech. f. & Aell.	<i>Dorema ammoniacum</i> D. Don.
<i>F. lutensis</i> Rech.f.	<i>D. aucheri</i> Boiss.
<i>F. macrocolea</i> (Boiss.) Boiss.	<i>Daucus carota</i> L. subsp. <i>Carota</i>
<i>F. microcolea</i> (Boiss.) Boiss.	

(2008)

در این مطالعه، برای نخستین بار روابط تبارشناختی جنس کمای ایران در مفهوم وسیع (*Ferula, Dorema, Laser* و *Leutea*) بر مبنای داده‌های ریخت‌شناختی بررسی، سپس روند تکاملی این صفات ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: عملیات صحرایی این تحقیق طی ماه‌های اردیبهشت، خرداد و تیر ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۸ صورت گرفت. گونه‌های جمع‌آوری شده (۷۵ نمونه و ۲۷ گونه) از رویشگاه‌های طبیعی، شناسایی و در هرباریوم پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی (MPH) تهران و هرباریوم گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان (HUI) ثبت و نگهداری گردید. کلیه گونه‌های استفاده شده در این تحقیق در جدول ۱، فهرست شده است.

ریخت‌شناختی: مبنای شکل‌گیری بیشتر تاکسون‌های شناخته شده، صفات ریخت‌شناختی

جدول ۲- صفات و حالات ریخت‌شناختی گونه‌های کمای به کار رفته در تحلیل کلادبستیک

صفت و حالت صفت	ساقه؛
	۱. کُرک: فاقد کُرک (۱)، واجد کُرک (۲)
	۲. ارتفاع: کمتر از ۸۰ سانتی‌متر (۱)، تا ۱۰۰ سانتی‌متر (۲)، بین ۱۰۰-۱۵۰ سانتی‌متر (۳)، بیشتر از ۱۵۰ سانتی‌متر (۴)
	۳. ضخامت قاعده: تا ۱ سانتی‌متر (۱)، ۱-۳ سانتی‌متر (۲)، ۳-۵ سانتی‌متر (۳)، بالاتر از ۵ سانتی‌متر (۴)
	۴. نسبت طول به ضخامت قاعده: تا ۳۰ (۱)، ۳۰-۵۰ (۲)، ۵۰-۱۰۰ (۳)، بالای ۱۰۰ (۴)
	۵. رنگ: زرد یا سبز (۱)، ارغوانی (۲)
	۶. وضعیت: منفرد (۱)، منشعب (۲)
	برگ قاعده‌ای؛
	۷. نوع پهنک: دو بار شانه‌ای (۱)، سه بار شانه‌ای (۲)، چهار بار شانه‌ای (۳)، پنج بار شانه‌ای (۴)، شش بار شانه‌ای (۵)، سه‌تایی (۶)
	۸. وضعیت کُرک در سطح تحتانی: فاقد کُرک (۱)، واجد کُرک (۲)
	۹. طول لب: زیر ۱ سانتی‌متر (۱)، ۱-۶ سانتی‌متر (۲)، ۶-۱۰ سانتی‌متر (۳)، بالای ۱۰ سانتی‌متر (۴)
	۱۰. عرض لب: کمتر از ۰/۱ سانتی‌متر (۱)، ۰/۱-۰/۲ سانتی‌متر (۲)، ۰/۲-۰/۲ سانتی‌متر (۳)، ۰/۲-۰/۵ سانتی‌متر (۴)، بالای ۱ سانتی‌متر (۵)
	۱۱. نسبت طول لب به عرض لب: زیر ۱۰ (۱)، ۱۰-۲۰ (۲)، بالای ۲۰ (۳)
	۱۲. شکل قطعات: خطی (۱)، نخ (۲)، پهن تخم‌مرغی، واژ تخم‌مرغی یا مستطیلی با عرض کمتر از ۱ سانتی‌متر (۳)، پهن تخم‌مرغی، واژ تخم‌مرغی یا مستطیلی با عرض بیشتر از ۱ سانتی‌متر (۴)، سازویی شکل (۵)
	غلاف فوقانی؛
	۱۳. طول: تا ۵ سانتی‌متر (۱)، ۵-۱۰ سانتی‌متر (۲)، بیشتر از ۱۰ سانتی‌متر (۳)
	۱۴. عرض: تا ۵ سانتی‌متر (۱)، ۵-۱۰ سانتی‌متر (۲)، بیشتر از ۱۰ سانتی‌متر (۳)
	۱۵. وضعیت کُرک: فاقد کُرک (۱)، واجد کُرک (۲)
	۱۶. جنس: چرمی (۱)، غشایی (۲)، علفی (۳)
	۱۷. وضعیت تورم: بدون تورم (۱)، کم‌تورم (۲)، شدیداً متورم (۳)
	برگه گریبانی؛
	۱۸. حضور: فاقد برگه یا واجد برگه ریزان (۱)، واجد برگه مانا (۲)
	گل آذین؛
	۱۹. نوع: پانیکول تُنک (۱)، پانیکول متراکم (۲)، چتر ساده و سرسان (۳)
	چتر؛
	۲۰. تعداد شعاع: تا ۱۰ عدد (۱)، ۱۰-۱۵ عدد (۲)، ۱۵-۲۵ عدد (۳)، بیشتر از ۲۵ عدد (۴)
	۲۱. تعداد گل: تا ۱۰ عدد (۱)، ۱۰-۱۵ عدد (۲)، ۱۵-۲۰ عدد (۳)، ۲۰-۲۵ عدد (۴)، انبوه (۵)
	۲۲. طول شعاع: تا ۲/۵ سانتی‌متر (۱)، ۲/۵-۴ سانتی‌متر (۲)، ۴-۵ سانتی‌متر (۳)، بیشتر از ۵ سانتی‌متر (۴)
	گلبرگ؛
	۲۳. طول: تا ۱ میلی‌متر (۱)، ۱-۱/۵ میلی‌متر (۲)، ۱/۵-۲ میلی‌متر (۳)، بیشتر از ۲ میلی‌متر (۴)
	۲۴. رنگ: سفید (۱)، زرد (۲)

۲۵. وضعیت گُرک: فاقد گُرک (۱)، واجد گُرک (۲)

مریکارپ؛

۲۶. طول: تا ۱۰ میلی‌متر (۱)، ۱۰-۱۲ میلی‌متر (۲)، ۱۲-۱۴ میلی‌متر (۳)، ۱۴-۱۶ میلی‌متر (۴)، بیشتر از ۱۶ میلی‌متر (۵)

۲۷. عرض: تا ۴ میلی‌متر (۱)، ۴-۶ میلی‌متر (۲)، ۶-۹ میلی‌متر (۳)، بیشتر از ۹ میلی‌متر (۴)

۲۸. نسبت طول به عرض: بیشتر از ۲: (۱)، ۱/۵-۲ (۲)، ۱-۱/۵ (۳)، کمتر از ۱ (۴)

۲۹. وضعیت گُرک: فاقد گُرک (۱)، واجد گُرک (۲)

۳۰. عرض بال: کمتر از ۱ میلی‌متر (۱)، ۱-۲ میلی‌متر (۲)، بیشتر از ۲ میلی‌متر (۳)

۳۱. تعداد کانال‌های شیرابه‌ای پشتی: منفرد (۱)، ۲ عدد (۲)، ۳ یا ۴ عدد (۳)، ۵ یا ۶ عدد (۴)، ۷ یا ۸ (۵)، بیشتر از ۸ عدد (۶)، فاقد کانال

(۷)

۳۲. تعداد کانال‌های شیرابه‌ای سطح داخلی: تا ۴ عدد (۱)، ۴-۶ عدد (۲)، ۶-۸ عدد (۳)، ۸-۱۰ عدد (۴)، ۱۰-۱۵ عدد (۵)، ۱۵-۲۰ عدد

عدد (۶)، بیشتر از ۲۰ عدد (۷)، فاقد کانال (۸)

تخمندان؛

۳۳. وضعیت گُرک: فاقد گُرک (۱)، واجد گُرک (۲)

امساکي، تحليل تکميلي خودراه‌انداز (بوت استرپ، bootstrap) با دسترسی بیشینه صفات (maximum characters) نیز انجام گرفت (Felsenstein, 1985). روش کار شامل جستجوی غیرمستدل (heuristic search) با افزایش تصادفی توالی‌ها (random addition of sequences) TBR، غیر مؤثر و مبادله شاخه‌ای (branch swapping) به روش نیمه‌سازی و اتصال مجدد درخت‌ها (TBR) با بیشینه درختان ذخیره شده به‌ازای هر تکرار در همه مراحل ۱۰۰۰ درخت انتخاب گردید.

بررسی روند تکاملی صفات: به منظور ارزیابی روند تکاملی کلیه صفات ریخت‌شناختی استفاده شده در این تحقیق، با استفاده از برنامه مک کلاد (Maddison and Maddison, 1992)، این داده‌ها بر درخت توافقی تبارشناختی حاصل از داده‌های مولکولی nrDNA ITS به روش امساکي (آماده انتشار از نویسنده این تحقیق و همکارانش) همپوشانی و کلیه صفات ریخت‌شناختی به صورت تک به تک ارزیابی گردید.

تحلیل کلادستیکی: ماتریس داده‌های ریخت‌شناختی کدبندی شده به‌عنوان پایگاه داده‌ای به روش امساکي (Maximum Parsimony) و با استفاده از نرم‌افزار *Win-PAUP نسخه 4.0b10 (Swofford, 2000) بررسی شدند (جدول ۳). در این روش کوتاه‌ترین درخت تکاملی (Strict Consensus Tree) به دست آمد. مناسب‌ترین درخت در واقع حداقل تعداد تغییرات حالات صفتی را ارائه می‌کند و لذا کمترین تغییرات را در طی فرآیند تکاملی با امساکي ترین میزان هموپلازی به‌نمایش می‌گذارد.

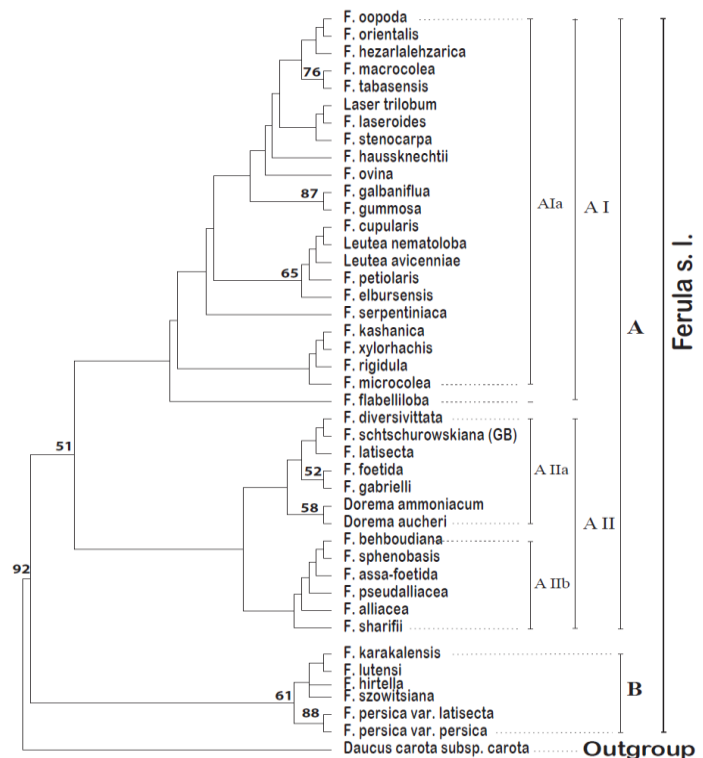
گونه *Daucus carota* subsp. *carota* بر اساس مطالعه Kurzyna-Mlynik و همکارانش (۲۰۰۸) به‌عنوان برون‌گروه و عامل قطبی شدن صفات (Maddison et al., 1984) انتخاب شد. در تنظیم ماکزیمم تعداد درختان (Set Maximum Trees)، این تعداد ۱۰۰۰۰ تعبیه شد. به منظور تشخیص و تعیین حدود اطمینان شاخه‌ها در درخت توافقی حاصل از تحلیل

بررسی روند تکاملی صفات ریخت‌شناختی: با وجود کارآیی بالای صفات کمی نظیر وضعیت بال روی میکارپ، تعداد کانال‌های شیرابه‌ای پشتی و شکمی، ارتفاع گیاه، ابعاد لب‌های برگ، تعداد چترها و چترک‌ها در رده‌بندی سنتی، نتایج ما نشان داد که این صفات وضعیت هموپلازی بالایی نشان می‌دهند (جدول ۴). به‌علاوه، برخی صفات کیفی نظیر منشعب یا غیر منشعب بودن ساقه، نوع پهنک، شکل قطعات برگ و نوع پانیکول نیز هموپلازی بالایی نشان داد. بیشترین هموپلازی مربوط به صفات وضعیت کُرک روی غلاف برگ (صفت ۱۵)، ساقه (صفت ۱) و سطح تحتانی برگ (صفت ۸) و کمترین میزان مربوط به وضعیت حضور یا عدم حضور برگه گریبانی (صفت ۱۸) و رنگ گلبرگ‌ها (صفت ۲۴) بود. شاخص هموپلازی (*Homoplasy Index*) شاخص ثبات، شاخص بقا، کمینه و بیشینه گام‌های تغییر صفات حاصل از تحلیل امساکي در جدول ۴ نشان داده شده‌است.

شکل ۱- درخت اجماع حاصل از تحلیل امساکي ۳۳ صفت کمی و کیفی ریخت‌شناختی گونه‌های کمای ایران (اعداد روی شاخه‌ها مربوط به عدد بوت‌استرپ است، اعداد کمتر از ۵۰ قید نگردیده‌است).

نبوده (uninformative)، طول درخت ۳۴۵ و تعداد درخت‌ها ۱۶ بود. درخت توافقی حاصل و بوت‌استرپ (BS) بالای ۵۰ برای میزان حمایت کلادها در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که *Daucus carota* subsp. *carota* به عنوان برون‌گروه خارج از شاخه کما در مفهوم وسیع بود و این نتیجه با BS نسبتاً بالایی (۹۲) حمایت شده بود. سایر تاکسون‌ها در دو کلاد A و B قرار گرفتند. این نتایج تک‌تباری بودن گونه‌های کما در مفهوم وسیع را نشان داد.

گروه A با ۳۶ عضو و BS پایین (۵۱) شامل دو زیرگروه A_I و A_{II} بود. در زیرگروه A_I گونه *F. flabelliloba* به عنوان گونه خواهری برای زیرشاخه A_{Ia} با ۲۱ عضو بود. در زیرگروه A_{II} دو زیرشاخه A_{IIa} با ۷ عضو و A_{IIb} با ۶ عضو از هم جدا افتادند. گروه B با ۶ عضو و BS پایین (۶۱) به عنوان گروه خواهری برای گروه A در شاخه‌ای جداگانه قرار گرفت.



جدول ۴- شاخص‌های هموپلازی ۳۳ صفت ریخت‌شناختی جنس کما در ایران بر اساس تحلیل کلادستیک

اندام	صفت	کمترین گام	بیشترین گام	شاخص ثبات	شاخص ابقا	اندکس هموپلازی
ساقه	۱. گُرک	۱	۱۴	۰/۰۸۳	۰/۱۵۴	۰/۹۱۷
	۲. ارتفاع	۳	۲۶	۰/۱۲۵	۰/۰۸۷	۰/۸۷۵
	۳. ضخامت قاعده	۳	۲۱	۰/۱۵۰	۰/۰۵۶	۰/۸۵۰
	۴. نسبت طول به ضخامت قاعده	۳	۲۶	۰/۱۲۵	۰/۰۸۷	۰/۸۷۵
	۵. رنگ	۱	۵	۰/۲۰۰	۰/۰۰۰	۰/۸۰۰
	۶. وضعیت	۲	۱۳	۰/۱۶۷	۰/۰۹۱	۰/۸۳۳
برگ قاعده‌ای	۷. نوع پهنک	۵	۲۹	۰/۲۰۸	۰/۲۰۸	۰/۷۹۲
	۸. وضعیت گُرک سطح تحتانی	۱	۱۳	۰/۰۸۳	۰/۰۸۳	۰/۹۱۷
	۹. طول لب	۳	۲۳	۰/۱۳۶	۰/۰۵۰	۰/۸۶۴
	۱۰. عرض لب	۴	۲۸	۰/۱۵۴	۰/۰۸۳	۰/۸۴۶
	۱۱. نسبت طول لب به عرض لب	۲	۱۲	۰/۱۶۷	۰/۰۰۰	۰/۸۳۳
	۱۲. شکل قطعات	۴	۲۸	۰/۱۶۰	۰/۱۲۵	۰/۸۴۰
غلاف برگ	۱۳. طول	۲	۲۰	۰/۱۱۱	۰/۱۱۱	۰/۸۸۸۹
	۱۴. عرض	۲	۱۳	۰/۱۶۱	۰/۰۹۱	۰/۸۳۳
	۱۵. وضعیت گُرک	۱	۱۸	۰/۰۵۹	۰/۰۵۹	۰/۹۴۱
	۱۶. جنس	۲	۱۴	۰/۱۶۷	۰/۱۶۷	۰/۸۳۳
	۱۷. وضعیت تورم	۲	۱۷	۰/۱۴۳	۰/۲۰۰	۰/۸۵۷
برگه	۱۸. وضعیت حضور	۱	۲	۰/۵۰۰	۰/۰۰۰	۰/۵۰۰
گل‌آذین	۱۹. نوع	۲	۱۹	۰/۱۱۸	۰/۱۱۸	۰/۸۸۲
چتر	۲۰. تعداد شعاع	۴	۲۸	۰/۱۴۸	۰/۰۴۲	۰/۸۵۲
	۲۱. تعداد گل	۴	۲۳	۰/۱۸۲	۰/۰۵۳	۰/۸۱۸
	۲۲. طول شعاع	۳	۲۱	۰/۱۵۰	۰/۵۵۶	۰/۸۵۰
گلبرگ	۲۳. طول	۳	۲۰	۰/۱۵۸	۰/۰۵۹	۰/۸۴۲
	۲۴. رنگ	۱	۳	۰/۳۳۳	۰/۰۰۰	۰/۶۶۷
	۲۵. وضعیت گُرک	۱	۱۲	۰/۱۱۱	۰/۲۷۳	۰/۸۸۹
مربکارپ	۲۶. طول	۴	۲۲	۰/۲۰۰	۰/۱۱۱	۰/۸۰۰
	۲۷. عرض	۳	۲۷	۰/۱۲۰	۰/۰۸۳	۰/۸۸۰
	۲۸. نسبت طول به عرض	۳	۲۳	۰/۱۵۰	۰/۱۵۰	۰/۸۵۰
	۲۹. وضعیت گُرک	۱	۷	۰/۲۰۰	۰/۳۳۳	۰/۸۰۰
	۳۰. عرض بال	۲	۹	۰/۲۲۲	۰/۰۰۰	۰/۷۷۸
	۳۱. تعداد کانال‌های شیرابه‌ای پشتی	۶	۲۵	۰/۲۶۱	۰/۱۰۵	۰/۷۳۹
تخمدان	۳۲. تعداد کانال‌های شیرابه‌ای سطح داخلی	۷	۳۰	۰/۲۵۹	۰/۱۳۰	۰/۷۴۱
	۳۳. وضعیت گُرک	۱	۷	۰/۲۰۰	۰/۳۳۳	۰/۸۰۰

رنگ ساقه با دو گام تغییر از ارغوانی در برون گروه به عنوان رنگ نیایی و زرد یا بی‌رنگ در اغلب گونه‌های کما دیده شد. تنها در چهار گونه

بر اساس این نتایج، ارزیابی روند تکاملی برخی صفات به ترتیب از کمترین به بیشترین گام‌های تغییر، به این شرح بود:

حمایت بالا تک‌نیا بوده، تمام گونه‌های کمای در یک شاخه تک‌نیا از برون‌گروه خود جدا افتادند.

بررسی آناتومی میوه، داده‌های ریخت‌شناختی و ایمنولوژی در کار Shishkin (۱۹۵۱) و Shneyer و همکارانش (۱۹۹۵) قرابت و نزدیکی جنس *Dorema* را به *Ferula* نشان داد، اگرچه مکان‌گیری این گونه در کلادوگرام آنها بسیار عجیب و دور از ذهن بود. برخلاف این نتایج، در مطالعه‌ای که Valiejo-Roman و همکاران (۲۰۰۶) روی روابط تبارشناختی برخی گروه‌های انحصاری چتریان در ایران بر مبنای داده‌های مولکولی ITS nrDNA انجام دادند، تنها گونه *Dorema aucheri* از مجموعه *Ferula* بیرون افتاده بود. همچنین بر اساس تحقیق Ajani و همکاران (۲۰۰۸)، دو گونه *Dorema ammoniacum* و *Dorema aucheri* در جنس *Ferula* قرار گرفتند. در گزارش آنها ۷ گونه *Dorema* همگی در گروه *Ferula* قرار گرفتند. به اعتقاد آنها انتقال این جنس به جنس کمای قطعی بوده، اما ساخت ترکیب جدید را موکول به بررسی‌های DNA کلروپلاستی دانستند. به علاوه، نتایج تحقیقات Kurzyna-Mlynik و همکارانش (۲۰۰۸)، نشان داد که *Dorema ammoniacum* در گروه *Ferula* قرار می‌گیرد و بر اساس نظر آنها این جنس باید به جنس *Ferula* منتقل شود. آنچه مسلم است نتایج ما نیز، بیانگر نزدیکی بیش از حد این جنس به *Ferula* بود. اگرچه گروه خواهری این دو گونه در تحلیل کلادیستیک بر مبنای داده‌های ریخت‌شناختی و مطالعه مولکولی با هم متفاوت بود.

همین وضعیت در مورد دو گونه *Leutea* ایران نیز دیده شد. در مطالعات Kurzyna-Mlynik و همکاران (۲۰۰۸) کلیه گونه‌های این جنس در درون جنس کمای

Leutea nematoloba f. *petiolaris*، *F. cupularis* و *L. avicennia* رنگ ارغوانی به شکل رجعتی و به رنگ زرد ظاهر شد. شاید همین عامل برگشتی به عنوان یکی از حالات صفتی ریخت‌شناختی گمراه‌کننده باعث شود تا تصور شود این گونه‌ها با سایر گونه‌های جنس *Ferula* تک‌تبار نباشد. در حالی که کلادوگرام منتج از تحلیل کلادیستیک داده‌های ریخت‌شناختی (شکل ۱، شاخه A1a) تک‌نیایی بودن جنس *Ferula* در مفهوم وسیع را نشان داد.

داشتن برگه‌گریانی در *Daucus Laser trilobum* و *carota* subsp. *Carota* از گونه *F. laseroides* و گروه تک‌نیای کمای در مفهوم وسیع دیده شد.

وضعیت کُرک‌های روی غلاف برگی با ۶ حالت تغییر دیده شد. غلاف برگی واجد کُرک (صفت نیایی) در برون‌گروه دیده شد و در مجموعه کمای به مفهوم وسیع در موارد مختلفی پدیده تغییر صفت دیده شد. وجود کُرک روی مریکارپ نیز با ۶ گام تغییر دیده شد. داشتن کُرک روی ساقه به‌عنوان صفتی جدید نسبت به برون‌گروه در غالب گونه‌های کمای ظاهر گردید، اگرچه وضعیت برون‌گروه در برخی گونه‌ها با پدیده رجعت حفظ شده بود.

غلاف چرمی در برون‌گروه دیده شد. حالت صفت برون‌گروه با ۸ گام تغییر در بیشتر گونه‌های کمای حفظ شده بود.

بحث

مقایسه تحلیل کلادیستیک بر مبنای داده‌های مولکولی ITS nrDNA (آماده انتشار از نویسنده این تحقیق و همکارانش) و داده‌های ریخت‌شناختی نشان داد که مجموعه کمای ایران در مفهوم وسیع و با

دانسته، آن را به جنس کما با ترکیب جدید زیر منتقل نمودند البته آنها قبل از ارایه ترکیب جدید، اساساً این گونه را به عنوان *Leutea laseroides* در نظر گرفته بودند.

Ferula laseroides (Akhani) Spalik et S. R. Downie, Plant. Syst. Evol. 2008

Basionym: *Leutea laseroides* Akhani Illus. Fl. Golestan Natl. Park 1: 341. 2005

Syn.: *Laser rechingeri* Akhani in Ann. Naturhist. Mus. Wien, 98 B (Suppl.): 99. 1996

گونه دیگر این گروه *Leutea petiolaris* بود که طبق نظر آنها با انتقال به جنس کما و حفظ نام قدیمی تر و معتبر خود، به عنوان هم نام برای *Ferula petiolaris* DC. در نظر گرفته شد. اضافه شدن دو گونه دیگر این جنس از ایران به تحلیل داده های مولکولی (آماده انتشار از نویسندگان این تحقیق و همکارانش) و ریخت شناختی، نشان داد که در تمام موارد گونه *Ferula elbursensis* به شکل پارافلیتیک با ۴ گونه دیگر در یک گروه تک نیا و در درون جنس کما قرار گرفتند (شکل ۱). مطابق نتایج این بررسی، دو گونه متعلق به ایران از جنس *Leutea* نیز به درون جنس کما منتقل و در اینجا دو ترکیب جدید به شرح زیر ساخته می شود:

Ferula nematoloba (Rech. f.) Kanani, comb. nov.

Basionym: *Peucedanum namatolobum* Rech. f.

Syn.: *Leutea nematoloba* (Rech. f.) M. Pimen.

Ferula avicennia (Mozaff.) Kanani, comb. nov.

Syn.: *Leutea avicennia* Mozaff.

Chamberlain و Rechinger (۱۹۸۷) در فلورا

ایرانیکا دو گونه *F. galbaniflua* و *F. gummosa* را

قرار گرفتند. بر این اساس، آنها با انتقال این جنس به جنس کما، دو ترکیب جدید زیر را ارائه کردند:

Ferula elbursensis (Mozaff.) Spalik et S. R. Downie, Plant. Syst. Evol. 2008

Basionym: *Leutea elbursensis* Mozaff., Bot. Z. 88 (4): 106. 2003

Ferula cupularis (Boiss.) Spalik et S. R. Downie, Plant. Syst. Evol. 2008

Basionym: *Peucedanum cupulare* Boiss., Diagn. pl. or. nov. ser. 1, 6: 63. 1846

Syn.: *Leutea cupularis* (Boiss.) Pimenov Fl. Iranica [Rechinger] 162: 446. 1987

دو گونه *Laser rechingeri* و *Laser trilobum* در تحلیل داده های مولکولی ما نیز وضعیت تبارشناختی کاملاً متفاوتی داشتند (آماده انتشار از نویسندگان این تحقیق و همکارانش)، تا حدی که گونه نخست کاملاً از مجموعه کما جدا و در برون گروه قرار گرفت اما گونه دوم در درون جنس کما و به عنوان یک گونه خواهری در کنار مجموعه *Leutea* منتقل شده به جنس کما، قرار گرفت. این وضعیت در بررسی Valiejo-Roman و همکاران (۲۰۰۶) نیز دیده شد. البته در پژوهش نویسندگان این مقاله، این دو گونه به عنوان دو گونه خواهری و به شکل پارافلیتیک با گونه *F. stenocarpa* تشکیل یک شاخه را دادند. بالا بودن شاخص هموپلازی (با میانگین ۰/۸۲۷) در صفات ریخت شناختی این گمان را به ذهن متبادر می سازد که قرار دادن این دو گونه در کنار هم و بر مبنای صفات ریخت شناختی، کاملاً گمراه کننده و نادرست خواهد بود. به همین دلیل Kurzyna-Mlynik و همکارانش (۲۰۰۸) تغییر در وضعیت نام علمی گیاه *Laser rechingerii* را مناسب

دو گونه خواهری در یک شاخه قرار داد. بنابراین، بر اساس نتایج مولکولی و ریخت‌شناختی این تحقیق، این دو گونه مطابق آنچه در فلورا ایرانیکا (Chamberlain and Rechinger, 1987) مطرح شده، به‌عنوان دو گونه هم‌نام لحاظ می‌شوند.

ملاحظه ارقام بالای مربوط به شاخص‌های هموپلازی صفات ریخت‌شناختی نشان داد که چیدمان تاکسون‌ها بر مبنای این صفات در مواردی که بحث قرابت‌های نیایی مطرح است، می‌تواند گمراه‌کننده باشد. این مهم خصوصاً در مورد وضعیت گُرک روی ساقه، غلاف برگگی و سطح تحتانی برگ کاملاً برجسته خواهد بود. به علاوه، این وضعیت در مورد حالات مختلف صفات مریکارپ نیز دیده می‌شود اگرچه تعداد کانال‌های هدایت شیرابه‌ای نسبت به وضعیت گُرک‌ها، شاخص هموپلازی پایین تری داشت.

سپاسگزاری

از کلیه همکاران پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهران، گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان و هرباریوم مؤسسه جنگلها و مراتع تهران به جهت فراهم کردن شرایط عالی برای این تحقیق و همچنین از آقایان دکتر علی سنبلی و دکتر ایرج مهرگان بابت همکاری صمیمانه با نویسنده قدردانی می‌شود.

هم‌نام تلقی کرده‌اند، تحلیل داده‌های شیمیایی اسانس این دو گونه را در یک گروه قرار داد (Kanani et al., 2011). اگرچه میزان بالای بتا-فلاندرن (۲۲/۷ درصد) و زیگما-کادینن (۷/۲ درصد) در *F. gummosa* و زیگما-۳-کارن و اندوفنچیل استات در *F. galbaniflua* از جمله اختلافات کیفی و شواهد خوبی برای تمایز کموسیستماتیکی این دو گونه بود، اما به نظر می‌رسد یکسانی توالی مولکولی سه گونه *F. badrakema*، *F. gummosa* و *F. galbaniflua* (آماده انتشار از نویسنده این تحقیق و همکارانش) و کنار هم قرار گرفتن این دو گونه در پژوهش حاضر، با حمایت نسبتاً خوب BS=87، کار Chamberlain و Rechinger (۱۹۸۷) مبنی بر هم‌نام کردن این دو گونه و تحقیق مظفریان (۱۳۸۶) در هم‌نام کردن دو گونه *F. badrakema* و *F. gummosa* را تأیید خواهد کرد. ما نیز در این تحقیق با تکیه بر این داده‌ها و تلفیق نظرات ارایه شده در فلورا ایرانیکا و فلور فارسی ایران هر دو گونه مذکور را با گونه *F. gummosa* به عنوان گونه‌های هم‌نام تلقی نمودیم.

نتایج این پژوهش نشان داد که دو گونه *F. hirtella* و *F. szowitziana*، به شکل پارافلیتیک با نیای غیرمستقیم در کنار *F. hirtella* قرار داشت. تحلیل داده‌های مولکولی (آماده انتشار از نویسنده این تحقیق و همکارانش) نیز نشان داد که توالی مولکولی این دو گونه کاملاً یکسان و هر دو را در کنار هم و به عنوان

منابع

- قهرمان، ا. (۱۳۷۲) سیستماتیک گیاهی، کورموفیت‌های ایران. جلد ۲، مرکز نشر دانشگاهی، تهران.
- مظفریان، و. (۱۳۸۶) فلور ایران، تیره چتریان (Umbelliferae). جلد ۵۴، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران.
- Ajani, Y., Ajani, A., Cordes, J. M., Watson, M. F. and Downie, S. R. (2008) Phylogenetic analysis of nrDNA ITS sequences reveals relationships within five groups of Iranian Apiaceae subfamily Apioidae. *Taxon* 57: 383-401.

- Chamberlain, D. F. and Rechinger, K. H. (1987) *Ferula* L. In: Flora Iranica, Umbelliferae. (eds. Hedg I. C., Lamond J. M. and Rechinger, K. H.) 162: 387-426. Akademische Druck- und Verlagsanstalt, Graz.
- Downie, S. R. and Katz-Downie, D. S. (1996a) A molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae: evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *American Journal of Botany* 83: 234- 251.
- Downie, S. R., Hartman, R. L., Sun, F. J. and Katz-Downie, D. S. (2002) Polyphyly of the spring-parsleys (*Cymopterus*): molecular and morphological evidence suggests complex relationships among the perennial endemic genera of western North American Apiaceae. *Canadian Journal of Botany* 80: 1295-1324.
- Downie, S. R., Katz-Downie, D. and Cho, K. J. (1996b) Phylogenetic analysis of Apiaceae subfamily Apioideae using nucleotide sequences from the chloroplast rpoC1 intron. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6: 1-18.
- Downie, S. R., Katz-Downie, D. S. and Spalik, K. (2000b) A phylogeny of Apiaceae tribe Scandiceae: Evidence from Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer sequences. *American Journal of Botany* 87: 76-95.
- Downie, S. R., Katz-Downie, D. S. and Watson, M. F. (2000a) A phylogeny of the flowering plants family Apiaceae based on Chloroplast DNA *rpl16* and *rpoC1* Intron sequences: Towards a supergeneric classification of subfamily Apioideae. *American Journal of Botany* 87: 273-292.
- Downie, S. R., Ramanath, S., Katz- Downie, D. S. and Llanas, E. (1998) Molecular systematics of Apiaceae subfamily Apioideae: Phylogenetic analyses of Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer and Plastid rpoC1 Intron sequences. *American Journal of Botany* 85: 563-591.
- Downie, S. R., Watson, M. F., Spalik, K. and Katz- Downie, D. S. (2000c) Molecular systematics of old world Apioideae (Apiaceae): Relationships among some members of tribe Peucedaneae sensu lato, the placement of several Island-endemic species, and resolution within the Apioideae Superclade. *Canadian Journal of Botany* 78: 506-528.
- Drude, C. G. O. (1898) Umbelliferae, In: Die natürlichen Pflanzenfamilien (eds. Engler A. and Prantl, K.) 3 63-250. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F. and Donoghue, M. J. (2007) *Plant systematics: A phylogenetic approach*, 3 ed. Sinauer Associate Inc. Publishers Sunderland Massachusetts U.S.A.
- Kanani, M. R., Rahiminejad, M. R., Sonboli, A., Mozaffarian, V., Kazempour, O. Sh. and Ebrahimi, N. S. (2011) Chemotaxonomic Significance of the Essential Oils of 18 *Ferula* (Apiaceae) Species from Iran. *Chemistry and biodiversity journal* 8: 503-517.
- Katz-Downie, D., Valiejo-Roman, C. M., Terentjeva, E. I., Troitsky, A. V., Pimenov, M. G. and Lee, B. (1999) Towards a molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae: additional information from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Plant Systematics and Evolution* 216: 167-195.
- Ke, S. X. (2005) *Ferula*. In: Flora of China, Apiaceae (Umbelliferae) 14.
- Korovin, E. P. (1939) Glavneischiye linii v sistematike roda *Ferula* (Tourn.) L. *Bulletin Society National Moscow Biology* 48: 5-15.
- Korovin, E. P. (1940) Differentsiruyuschchaya rol uslovii suschestvovaniya v evolutsii rasteniy.

- Rod *Ferula* L. In: Keller BA (ed) *Rasteniye i sreda*. Izdat. Akademii Nauk SSSR. Moskva. 237-274.
- Korovin, E. P. (1947) *Generis Ferula* (Tourn.) L. monographia illustrata. Academiae Scientiarum UzRSS, Tashkent.
- Korovin, E. P. (1951) *Ferula* L. In: *Flora SSSR* (ed. Schischkin, B. K.) 17: 62-142. Izdatelstvo Akademii Nauk SSSR, Moskva.
- Korovin, E. P. (1959) *Ferula* L. In: *Flora Uzbekistana* (ed. Vvedensky A. I.) 4: 399-438. Izdatelstvo Akademii Nauk Uzbekskoi SSR, Tashkent.
- Kurzyna-Mlynik, R., Oskolski, A. A., Downie, S. R., Kopacz, R., Dzka, A. W. and Spalik, K. (2008) Phylogenetic position of the genus *Ferula* (Apiaceae) and its placement in tribe Scandiceae as inferred from nrDNA ITS sequence variation. *Plant Systematics and Evolution*
- Maddison, W. P. and Maddison, D. R. (1992) *MacClade: Analysis of phylogeny and evolution*, ver. 3.01. ed. Sinauer, Sunderland, MA.
- Maddison, W. P., Donoghue, M. J. and Maddison, D. R. (1984) Outgroup analysis and parsimony. *Systematic Zoology* 33: 83-103.
- Nasir, E. (1972) *Ferula* In: *Flora of West Pakistan*, Pakistan.
- Pesmen, H. (1972) *Ferula*. In: *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (ed. Davis P. H.) 4: 440-453. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Pimenov, M. and Leonov, M. (1993) *The genera of Umbelliferae*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Pimenov, M. and Leonov, M. (2004) The Asian Umbelliferae biodiversity database (ASIUM) with particular reference to South-West Asian taxa. *Turkish Journal of Botany* 28: 139-145.
- Safina, L. K. and Pimenov, M. G. (1990) Carpology of the species of type subgenus of the *Ferula* and some problems of their systematics. *Feddes Repertorium* 101: 135-151.
- Safina, L. K. and Pimenov, M. G. (1984) *Feruly Kazakhstana*. Izdatelstvo Nauka Kazakhskoy SSR, Alma-Ata.
- Shishkin, B. K. (1951) *Ferula*. In: *Flora of the USSR*. (eds. Lorch, J. and Lavoott, R.) 17. Koeltz Scientific Books, Moskova-Leningrad, Russia.
- Shneyer, V. S., Borschtschenko, G. P. and Pimenov, M. G. (1995) Immunochemical appraisal of relationships within the tribe Peucedaneae (Apiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 198: 1-16.
- Spalik, K., Reduron, J. P. and Downie, S. R. (2004) The phylogenetic position of *Peucedanum sensu lato* and allied genera and their placement in tribe Selineae (Apiaceae, subfamily Apioideae). *Plant Systematics and Evolution* 243: 189-210.
- Spalik, K., Weojewodzka, A. and Downie, S. R. (2001a) Delimitation of genera in Apiaceae with examples from Scandiceae subtribe Scandicinae. *Edinburgh Journal of Botany* 58: 331-346.
- Spalik, K., Wojewódzka, A. and Downie, S. R. (2001b) The evolution of fruit in Scandiceae subtribe Scandicinae (Apiaceae). *Canadian Journal of Botany* 79: 1358-1374.
- Swofford, D. L. (2000) *PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) and other methods* (Version 4 ed.). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Valiejo-Roman, C. M., Terentieva, E. I., Samigullin, T. H., Pimenov, M. G.-N. and Mozaffarian, V. (2006) Molecular data (nrITS-sequencing) reveal relationships among Iranian endemic taxa of the Umbelliferae. *Feddes Repertorium* 117: 367-388.

مطالعه فلور منطقه ریشه و پاقلعه شهرستان شهربابک استان کرمان

عاطفه صابری^۱، زهرا حسن آبادی^۲، سید منصور میرتاج‌الدینی^{۱*} و وحیده ناظری^۳
^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران
^۲ گروه گیاهان دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهربابک، شهربابک، ایران
^۳ گروه علوم باغبانی، دانشکده منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

در این بررسی، گیاهان خودروی منطقه ریشه و پاقلعه از توابع شهرستان شهربابک واقع در استان کرمان جمع‌آوری و شناسایی شد. این منطقه در حدود ۶۰ کیلومتری شمال شرق شهربابک و ۳۰۰ کیلومتری غرب شهر کرمان قرار گرفته است. مساحت این منطقه در حدود ۴۰۰۰۰ هکتار و ارتفاع متوسط آن از سطح دریا ۲۳۰۰ متر است. همچنین، این منطقه از مناطق خشک و کوهستانی محسوب می‌شود و در ناحیه ایرانی-تورانی قرار دارد و از نظر سیمای پوشش گیاهی، استپ یا بوته‌زاری و گیاه غالب آن، درمنه دشتی است. حدود ۱۰۰۰ نمونه گیاهی از این منطقه جمع‌آوری و شناسایی گردید. در مجموع، ۲۰۵ گونه گیاهی متعلق به ۴۱ تیره و ۱۵۱ جنس تشخیص داده شد که از این میان ۳۷ تیره، ۱۳۲ جنس و ۱۸۲ گونه متعلق به دولپه‌ای‌ها و ۴ تیره، ۱۹ جنس و ۲۳ گونه مربوط به تک‌لپه‌ای‌ها بودند. بزرگترین آنها تیره کاسنی با ۳۳ گونه و بزرگترین جنس، جنس گون با ۱۶ گونه بود. همچنین، ۹ گونه نادر، ۳۳ گونه بوم‌زاد و ۱۳ جنس تک‌گونه‌ای در این منطقه شناسایی شد. ۸۶ درصد گونه‌های مطالعه شده از نظر جغرافیای گیاهی متعلق به ناحیه ایرانی-تورانی هستند. اشکال زیستی این منطقه ۴۵/۵ درصد همی کریپتوفیت، ۳۴/۵ درصد تروفیت، ۹/۵ درصد کامفیت، ۵/۵ درصد ژئوفیت و ۵ درصد فانروفیت هستند.

واژه‌های کلیدی: ریشه و پاقلعه، شکل زیستی، شهربابک، فلور، کرمان

مقدمه

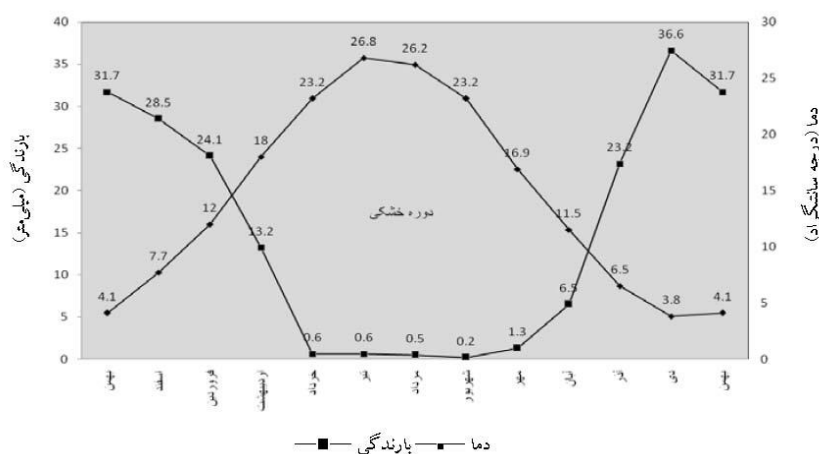
آنها به منظور حفظ محیط‌زیست را امکان‌پذیر می‌نماید. بعد دیگر شناخت گیاهان، تعیین پوشش گیاهی و تکمیل فلور کشور است که با توجه به تنوع اقلیم و در نتیجه تنوع گونه‌های گیاهی آن با وجود جمع‌آوری‌های متعدد و تحقیقات بسیاری که توسط گیاه‌شناسان، انجام شده است، اما هنوز مناطق بسیاری وجود دارد که گیاهان

شناخت فلور و شناسایی گونه‌های مقاوم، مهاجم، بوم‌زاد، نادر، در حال انقراض و گیاهان دارویی نقش عمده‌ای در تعیین پتانسیل زیستی محیط دارد و تا حدود زیادی دستیابی به اطلاعات در زمینه توان زیستی منطقه و برنامه‌ریزی جهت حفاظت، احیا و بهره‌برداری اصولی از

به کمربند دهج-ساردو قرار دارد. رودخانه پاقله از مهم ترین رودخانه های این منطقه است که در بخش های بالایی به صورت دایم و در قسمت های پایین دست به صورت فصلی جریان دارد. رودخانه ریشه نیز به صورت فصلی در بخش جنوبی منطقه جریان دارد. طبق گزارش های سازمان هواشناسی در سطح ایستگاه های شهرستان و روستا، میانگین تراز شده کمینه، بیشینه و روزانه دما در بررسی رژیم حرارتی منطقه، با حداقل دمای ۱/۷ درجه و حداکثر ۲۳ درجه و روزانه ۱۳/۶ درجه سانتیگراد اعلام و بیشینه بارش سالانه در ایستگاه های منطقه ۱۹۶/۲ میلی متر گزارش شده است. شکل ۱ منحنی آمبروترمیک منطقه را طبق آمار سال های ۱۳۷۵ تا ۱۳۸۷ نشان می دهد. با توجه به آمار ایستگاه سینوپتیک شهر بابک، میانگین درجه حرارت سالانه در این منطقه ۱۴/۶ درجه سانتیگراد و تعداد روزهای یخبندان ۹۴ روز است که از اواخر مهر ماه شروع شده، تا اوایل اردیبهشت ماه ادامه می یابد. میانگین بارندگی سالانه ۲۰۹/۸ میلی متر است. بیشینه رطوبت نسبی در آذر ماه با ۶۸ درصد و کمینه آن در مرداد ماه با ۲۱/۵ درصد به وقوع می پیوندد و میانگین سالانه رطوبت نسبی ۴۱ درصد است (بیگلری، ۱۳۸۵).

آن جمع آوری و شناسایی نشده است. گیاهان منطقه شهر بابک به طور پراکنده جمع آوری شده اند که می توان به جمع آوری های و کیلی (۱۳۷۸) و حسن آبادی (۱۳۸۳) اشاره نمود اما تاکنون از منطقه ریشه و پاقله جمع آوری مدونی صورت نگرفته است. سیمای کلی پوشش گیاهی منطقه با بوته های درمنه مشخص می شود که در برخی مناطق با گونه هایی از گون یا درختچه هایی چون دیو خار (*Lycium depressum* Stocks.)، نسترن (*Rosa moschata* J. Hermann.)، گز (*Tamarix ramosissima* Ladeb.)، زالک (*Crataegus meyeri* Pojark.)، زرشک (*Berberis integerrima* Bunge.) همراه می شوند.

شهرستان شهر بابک در شمال غربی استان کرمان واقع شده است. این شهرستان از شمال و غرب به استان یزد، از شرق به شهرستان رفسنجان و از جنوب به شهرستان سیرجان محدود می شود (بیگلری، ۱۳۸۵). منطقه مطالعه شده، در فاصله حدود ۳۰۰ کیلومتری شهر کرمان و ۶۰ کیلومتری شمال شرقی شهر مرکزی شهر بابک و در محدوده دو دهستان ریشه و پاقله، با مساحتی در حدود ۴۰۰۰۰ هکتار و ارتفاع متوسط ۲۳۰۰ متر از سطح دریا و در مسیر ارتفاعات مرکزی ایران و به طور جزئی تر در مسیر رشته کوهی موسوم



شکل ۱- منحنی آمبروترمیک منطقه ریشه و پاقله طی دوره آماری ۱۳۷۵-۱۳۸۷

مواد و روش‌ها

به دلیل اهمیت زیاد نمونه برداری در یک تحقیق فلوریستی (فلوریستیک) و به منظور شناخت هر چه بهتر ترکیب و اجزای فلوری منطقه، این کار به طور برنامه‌ریزی شده و با توجه به آغاز فصل رویش در این منطقه، در صدر امور قرار داده شد. نخستین جمع‌آوری در پاییز ۱۳۸۶ صورت گرفت. به دلیل کوهستانی و سرد بودن منطقه، فصل رویشی عمده گیاهان آن از اواسط فروردین آغاز می‌شود. اما برای جمع‌آوری کامل گیاهان علاوه بر فصل پاییز، دو دوره در فصل زمستان سال ۱۳۸۶ نیز جمع‌آوری صورت گرفت. سپس با آغاز فصل بهار (۱۳۸۷) فاصله بین جمع‌آوری‌ها کوتاه‌تر شد و هر هفته دو بار تا اواسط تیر ماه همان سال جمع‌آوری صورت گرفت. سپس چند دوره جمع‌آوری دیگر هم تا اواخر شهریور ماه صورت گرفت. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری و خشک کردن، بر روی مقوای هرباریومی الصاق گردیدند. اطلاعاتی همچون نام تیره، نام گونه، محل دقیق جمع‌آوری، تاریخ جمع‌آوری، نام جمع‌آوری کننده و شناسایی کننده و ارتفاع محل در کنار نمونه پیوست گردید. بیش از ۱۰۰۰ نمونه گیاهی جمع‌آوری و با فلورهای فلورا ایرانیکا (Rechinger, 1963-1998، فلور رنگی ایران (قهرمان، ۱۳۶۲-۱۳۸۲)، رُستنی‌های ایران (مبین، ۱۳۵۴-۱۳۷۴)، رده‌بندی گیاهی (مظفریان، ۱۳۷۳)، گون‌های ایران (معصومی، ۱۳۶۵-۱۳۸۵)، گونه‌های جدید و جالب توجه از جنس گون در ایران (معصومی و وکیلی، ۱۳۸۱) و شالوده جغرافیای گیاهی خاورمیانه (Zohary, 1973) شناسایی شدند که در هرباریوم دانشکده کشاورزی کرج دانشگاه تهران نگهداری می‌شوند. تعیین اشکال زیستی و گونه‌های بوم‌زاد با استناد به

کتاب‌های فلورا ایرانیکا (Rechinger, 1963-1998)، فلور ایران (اسدی و همکاران، ۱۳۶۷-۱۳۸۷) و تنوع زیستی گونه‌های گیاهی ایران (قهرمان و عطار، ۱۳۷۷) انجام شد.

نتایج

با بررسی فلور منطقه ریسه و پاقلعه، ۲۰۵ گونه گیاهی متعلق به ۴۱ تیره و ۱۵۱ جنس شناسایی شد (شکل ۲). بزرگترین تیره‌های دولپه‌ای به ترتیب: تیره آفتابگردان (Asteraceae) با ۲۵ جنس و ۳۳ گونه، باقلانیان (Fabaceae) با ۱۲ جنس و ۲۷ گونه، تیره نعناع (Lamiaceae) با ۱۱ جنس و ۱۹ گونه و تیره شب‌بو (Brassicaceae) با ۱۳ جنس و ۱۵ گونه بودند (شکل ۴). بیشترین گونه‌ها متعلق به دولپه‌ای‌ها، جنس *Astragalus* L. از تیره باقلانیان با ۱۶ گونه و *Nepeta* L. از تیره نعناع با ۷ گونه بودند (شکل ۵). بزرگترین تیره‌های تک‌لپه به ترتیب گندمیان (Poaceae) با ۱۳ جنس و ۱۶ گونه و تیره لاله (Liliaceae) با ۴ جنس و ۵ گونه بودند که ۹/۸ درصد گونه‌های منطقه را به خود اختصاص می‌دهند. بیشترین گونه‌ها در تک‌لپه‌ای‌ها متعلق به جنس *Allium* L. از تیره لاله و *Eremopyrum* Jaub. & Spach و *Poa* L. و *Bromus* L. از تیره گندمیان هر کدام با دو گونه بودند. گرچه در دید کلی، منطقه توسط گونه‌های *Artemisia* L. پوشیده شده، اما اختلاف ارتفاع و وجود اقلیم‌های خُرد و شرایط بوم‌شناختی مختلف سبب رویش گیاهان مختلفی در منطقه شده است. علاوه بر گروه فراگیر درمنه (*Artemisia sieberi* Besser)، برخی از گونه‌های گیاهی دیگر نیز به صورت اجتماعات گسترده در منطقه دیده می‌شوند. از جمله،

کامفیت‌ها (۳۳ گونه) بیشترین آنها تیره باقلانیان (۱۱ گونه)، فانروفیت‌ها (۱۰ گونه) بیشترین آنها تیره گل‌سرخ (۴ گونه) و ژئوفیت‌ها (۱۰ گونه) که بیشترین آنها از تیره لاله و گرامینه (هر کدام ۴ گونه) بود. در مجموع، ۴۵/۵ درصد گونه‌ها همی کریپتوفیت، ۳۴/۵ درصد تروفیت، ۹/۵ درصد کامفیت، ۵ درصد فانروفیت و ۵/۵ درصد ژئوفیت بودند.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از بررسی فلورزیستیک منطقه ریشه و پاقلعه نشان می‌دهد که از حدود ۸۰۰۰ گونه گزارش شده در کشور ۲۰۵ گونه یعنی ۲/۳ درصد آنها در منطقه مطالعه شده، یافت شدند. ۱۹ گونه که اسامی آنها در جدول ۱ آمده است، بر اساس منابع منتشر شده تاکنون از منطقه جنوب شرق کشور گزارش نشده‌اند. هر چند با توجه به خشکسالی چند سال اخیر و کاهش رویش بسیاری گونه‌های تروفیت و حتی عدم رشد و فعالیت برخی گونه‌های همی کریپتوفیت و برخی گونه‌های دیگر، منطقه تنوع اصلی خود را نشان نمی‌دهد، اما با توجه به قرار داشتن این منطقه در بخش کم باران مرکزی ایران، شناسایی ۲۰۵ گونه گیاهی متعلق به ۱۵۱ جنس و ۴۱ تیره، نشان‌دهنده تنوع زیستی نسبتاً خوبی در این منطقه است. با توجه به مساحت منطقه (حدود ۴۰۰۰۰ هکتار و حدود ۰/۰۲۴ درصد مساحت ایران)، حدود ۲۴ درصد تیره‌ها، ۱۲ درصد جنس‌ها و ۳/۲ درصد گونه‌های گیاهی ایران در این محدوده یافت می‌شوند که در مقایسه با مناطق دیگر و نسبتاً نزدیک به آن که از نظر فلورزیستیکی بررسی شده‌اند نیز تنوع قابل قبولی نشان می‌دهد. برای مثال: جوزم شهر بابک با ۷۴۰۰۰ هکتار وسعت و ۴۲۰ گونه

جامعه بادام (*Amygdalus scoparia* Spach.)، جامعه درمنه سفید (*Artemisia santolina* Schrenk.)، جامعه درمنه آبراهه‌ای (*Artemisia deserti* Krasch) جامعه سریش (*Eremurus* sp.)، جامعه تخریبی تلخ بیان (*Sophora alopecuroides* L.) و جوامع گون (*Astragalus* spp.) در مقابل، برخی گونه‌ها نیز به صورت اندک و نادر هستند که از بین ۱۴۰۵ گونه نادر در ایران، ۹ گونه (۰/۶۴ درصد) آنها در این منطقه مشاهده شدند، به عبارتی، ۴/۴ درصد گونه‌های گیاهی منطقه نادر هستند (جدول ۱). از حدود ۱۸۱۰ گونه گیاهی انحصاری در ایران، ۳۳ گونه (۱/۸۲ درصد) از آنها در منطقه مورد مطالعه وجود دارد و ۱۶/۱ درصد گونه‌های گیاهی منطقه، بوم‌زاد ایران هستند (جدول ۱). در این منطقه ۱۳ جنس تک‌گونه‌ای یافت شد که در مقایسه با ۵۵۶ جنس تک‌گونه‌ای در ایران (قهرمان و عطار، ۱۳۷۷) ۲/۳۳ درصد و در مقایسه با ۱۵۰ جنس در منطقه ۸/۷ درصد آنها تک‌گونه‌ای بودند. بیشترین جنس‌های تک‌گونه‌ای متعلق به تیره شب‌بو (*Brassicaceae*) بود (جدول ۱). تنوع گونه‌های علفی و بوته‌ای منطقه نسبت به گونه‌های درختی و درختچه‌ای بیشتر است. از گونه‌های درختی و درختچه‌ای منطقه می‌توان به بادام (*Amygdalus scoparia*)، نسترن شیرازی (*Rosa moschata* J. Hermann.) و گز (*Tamarix ramosissima* Ladeb.) اشاره نمود.

بررسی اشکال زیستی منطقه نشان می‌دهد که بیشتر گونه‌های گیاهی همی کریپتوفیت (۹۱ گونه) هستند که بیشترین آنها مربوط به تیره‌های کاسنی (۲۰ گونه) و نعناع (۱۱ گونه) بودند. سایر اشکال زیستی منطقه به این ترتیب زیر بود: تروفیت‌ها (۶۹ گونه) که بیشترین آنها تیره‌های شب‌بو (۱۳ گونه) و کاسنی (۹ گونه) بود.

سرد و خشک در منطقه است. همچنین، بالا بودن درصد تروفیت‌ها نشان‌دهنده طولانی بودن دوره خشکی است. بنابراین، منطقه از اقلیم سرد و خشک برخوردار است (شکل ۳). انتشار جغرافیایی گیاهان منطقه مطالعه شده نشان می‌دهد که گونه‌هایی با انتشار جغرافیایی ایرانی-تورانی ۵۴ درصد، ایرانی-تورانی / هیرکانی ۱۰ درصد، ایرانی-تورانی / اروپا-سیبری ۷ درصد، ایرانی-تورانی / صحرا-سندی ۱۰ درصد و ایرانی-تورانی / هیرکانی / صحرا-سندی ۷ درصد و جهان‌وطن ۷ درصد هستند (شکل ۶).

(حسن‌آبادی، ۱۳۸۳)، گوگر بافت با ۱۵۰۰۰ هکتار وسعت و ۴۱۴ گونه گیاهی (میرتاج‌الدینی، ۱۳۷۵). بررسی پراکنش جغرافیایی نشان داد که درصد بالایی از گیاهان متعلق به ناحیه ایرانی-تورانی هستند و شکل زیستی غالب منطقه را همی کریپتوفیت‌ها تشکیل می‌دهند. بالا بودن درصد گیاهان همی کریپتوفیت در منطقه که جوانه رویشی آنها در زمستان‌های سرد در سطح خاک با بقایای شاخ و برگ سال‌های قبل و یا برف پوشیده و حفاظت می‌شوند، به همراه منحنی آمبروترمیک (شکل ۱) نشان‌دهنده حاکمیت اقلیمی

جدول ۱- فهرست شکل زیستی، بوم‌زاد، نادر و تک‌گونه‌ای گیاهان و پراکنش جغرافیایی منطقه. شکل زیستی: Th؛ تروفیت‌ها، Ch: کامفیت‌ها، Ge: ژئوفیت‌ها، He: همی کریپتوفیت‌ها، Ph: فانروفیت‌ها. پراکنش جغرافیایی: Cosm: جهان‌وطن، IT: ایرانی-تورانی، H: هیرکانی، SS: صحرا-سندی، ES: اروپا-سیبری، En: بوم‌زاد، Ra: نادر، Mo: تک‌گونه‌ای. * گونه‌هایی که تاکنون از منطقه جنوب شرق ایران گزارش نشده‌اند.

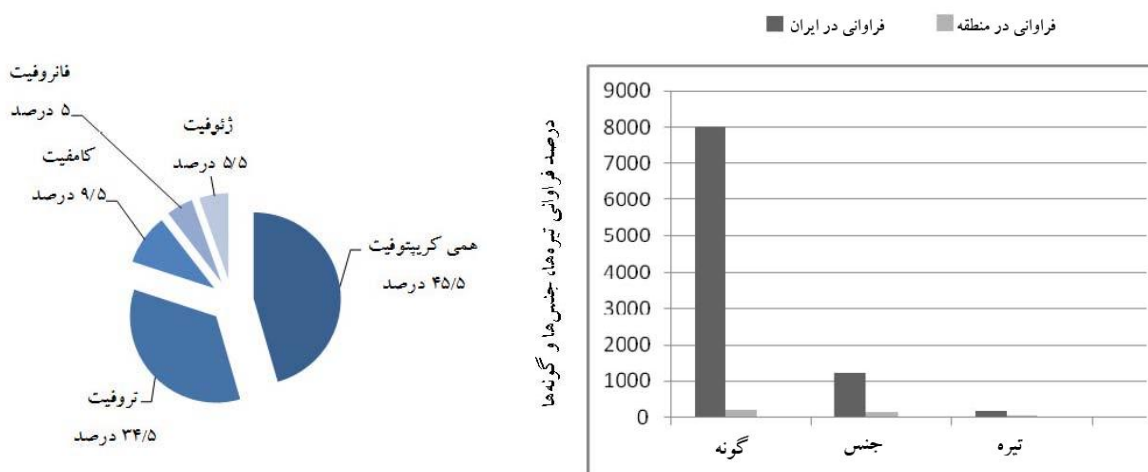
	تاکسون	شکل زیستی	منطقه رویشی	بوم‌زاد، نادر، تک‌گونه‌ای
Dicotyledones				
Berberidaceae				
	<i>Berberis integerrima</i> Bunge.	Ph	Cosm	
Boraginaceae				
	<i>Lappula sinaica</i> (DC.) Ascherson	Th	Cosm	
	<i>Microparacaryum bungei</i> (Boiss.) khat.	Th	IT	
	<i>Onosma stenosphon</i> Boiss.	He	IT	En
	<i>Paracaryum modesum</i> Boiss.	He	IT	En
	<i>Paracaryum pygmaeum</i> (Rech.) Heller	He	IT	En,*
	<i>Rochelia disperma</i> (L. F.) Koch.	Th	Cosm	
	<i>Solenanthus circinatus</i> Ledeb	Th	IT,H	*
	<i>Trachelanthus cerinthoides</i> Kunze	He	IT	Mo,*
Campanulaceae				
	<i>Campanula kermanica</i> (Rech.f., Aellen & Esfand.) Rech.f.	He	IT	Ra,
Capparaceae				
	<i>Cleome heratensis</i> Bge. & Bien. ex Boiss.	He	IT	
Caprifoliaceae				
	<i>Lonicera nummulariifolia</i> Jaub. & Spach	Ph	IT	
Caryophyllaceae				
	<i>Acanthophyllum juniperinum</i> Mobayen.	Ch	IT	En
	<i>Dianthus pulverulentus</i> Stapf.	He	IT	
	<i>Lepyrodiclis cevastioides</i> Stapf.	Th	IT, ES	
	<i>Silene conoidea</i> L.	Th	ES	
	<i>Silene pungens</i> Boiss.	He	IT	
Chenopodiaceae				
	<i>Chenopodium novopokrovskyanum</i> (Aellen) Uotila	Th	IT, H	
	<i>Chenopodium botrys</i> L.	He	IT, H	
	<i>Noaea mucronata</i> Asch. & Schweinf.	He	IT	
Asteraceae				
	<i>Achillea wilhelmsii</i> C. Koch	He	IT	
	<i>Acroptilon repens</i> (L.) DC. subsp. <i>australe</i> (Iljin) Rech.f.	He	ES	

تاکسون	شکل زیستی	منطقه رویشی	بوم‌زاد، نادر، تک‌گونه‌ای
<i>Aegopordon berardioides</i> Boiss.	He	IT	En
<i>Anthemis austro-iranica</i> Rech.F.	Th	IT, SS	En
<i>Anthemis rhodocentra</i> Iranshahr	Th	IT	En
<i>Artemisia deserti</i> Krasch	Ch	IT	
<i>Artemisia santolina</i> Schrenk.	Ch	IT	
<i>Artemisia sieberi</i> Besser.	Ch	IT	
<i>Carthamus oxycantha</i> M.	He	IT, Cosm	
<i>Centaurea pulchella</i> Ledeb.	Th	IT	
<i>Cousinia bormulleri</i> C. Winkl.	He	IT	En
<i>Cousinia calcitrapa</i> Boiss.	He	IT	En
<i>Cousinia iranica</i> C. Winkl. & Strauss.	He	IT	Ra
<i>Crepis sancta</i> (L.) Babcock.	He	IT, SS	
<i>Echinops ceratophorus</i> Boiss.	He	IT	En
<i>Gnapalium luteoalbum</i> L.	Th	IT	
<i>Gundelia tournefortii</i> L.	He	IT, ES	Mo
<i>Lactuca glaucifolia</i> Boiss.	He	IT	
<i>Lactuca serriola</i> L.	He	IT, ES	
<i>Onopordon leptolepis</i> DC.	He	IT	
<i>Phagmalon nitidum</i> Fresen.	He	IT	En
<i>Picris strigosa</i> M.B.	He	IT	En
<i>Pulicaria gnaphalodes</i> (Vent.) Boiss.	He	IT	
<i>Scorzonera tortuosissima</i> Boiss.	He	IT	
<i>Senecio glaucus</i> L.	Th	IT, ES	
<i>Sonchus asper</i> L.	Th	Cosm	
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Th	Cosm	
<i>Sonchus tenerrimus</i> L.	He	Cosm	
<i>Taraxacum syriacum</i> Boiss.	He	IT	
<i>Thevenotia persica</i> DC.	Th	IT	
<i>Tragopogon graminifolius</i> DC.	Th	ES	
<i>Varthemia persica</i> DC.	He	IT	Ra
Convolvulaceae			
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Th	Cosm	
<i>Convolvulus leiocaycinus</i> Boiss.	Ph	IT, SS	
Brassicaceae			
<i>Alyssum dasycarpum</i> Steph. ex Willd.	Th	IT	
<i>Alyssum linifolium</i> Stephan ex .willd.	Th	IT, H, SS	
<i>Arabidopsis wallichii</i> (Hook.;f. & Thoms)	Th	IT	
<i>Arabis aucheri</i> Boiss.	Th	IT	
<i>Barbarea plantaginea</i> DC.	He	IT, H	
<i>Brassica napus</i> L.	Th	IT, H, SS	
<i>Brassica rapa</i> L.	Th	IT, SS	
<i>Camelina rumelica</i> Velen.	Th	IT, H	
<i>Cardaria draba</i> (L.) Desv	He	IT, H, SS	Mo
<i>Chorispora tenella</i> DC.	Th	IT, H	
<i>Clypeola jonthlaspi</i> L.	Th	IT, H	
<i>Descurainia sophia</i> (L.) Webb ex Prantl	Th	IT, H	Mo
<i>Hirschfeldia incana</i> (L.) Lagreze-Fossat	Th	IT, H, SS	Mo
<i>Pachypterygium brevipes</i> Bge.	Th	IT	
<i>Robeschia schimperi</i> (Boiss.) O. E. Schulz	Th	IT, SS	Mo
Dipsacaceae			
<i>Pterocephalus gedrosiacus</i> Rech.f., Aellen & Esfand.	He	IT	Ra
Euphorbiaceae			
<i>Euphobia connata</i> Boiss.	He	IT	
<i>Euphobia erytradenia</i> Boiss.	He	IT	En
<i>Euphorbia hebecarpa</i> Boiss.	He	IT	
<i>Euphorbia heteradena</i> Joub. & SP.	He	IT	

تاکسون	شکل زیستی	منطقه رویشی	بوم‌زاد، نادر، تک‌گونه‌ای
<i>Euphorbia turcomanica</i> Boiss.	He	IT	
Fumariaceae			
<i>Fumaria asepala</i> Boiss.	Th	IT, H	
Gentianaceae			
<i>Centaurea pulchella</i> Ledeb.	He	Cosm	
Geraniaceae			
<i>Biebersteinia multifida</i> DC.	Ge	IT, H	Mo
<i>Erodium cicutarium</i> (L.)	Th	Cosm	
<i>Geranium stepporum</i> Davis.	Th	IT	
Lamiaceae			
<i>Acinos graveolens</i> (M. B.) Link.	Th	IT, ES	
<i>Ajuga chamaecistus</i> Ging. ex Benth.	Ch	IT	En
<i>Ballota aucheri</i> Boiss.	He	IT	
<i>Marrubium vulgare</i> L.	He	IT, ES	
<i>Mentha longifolia</i> (L.) Hupson.	He	ES	En
<i>Nepeta bracteata</i> Benth.	Th	IT	
<i>Nepeta glomerulosa</i> Boiss.	He	IT	En
<i>Nepeta menthoides</i> Boiss.	He	IT	En
<i>Nepeta persica</i> Boiss.	He	IT	
<i>Nepeta saccharata</i> Bunge.	Th	IT	En
<i>Nepeta schiraziana</i> Boiss.	Th	IT	En
<i>Nepeta sessilifolia</i> Bunge.	He	IT	En
<i>Salvia ceratophylla</i> L.	He	IT, ES	
<i>Salvia macrosiphon</i> Boiss.	He	IT	
<i>Scutellaria multicaulis</i> Boiss.	He	IT	
<i>Sideritis montana</i> L.	Th	IT, ES	
<i>Teucrium polium</i> L.	He	IT, ES	
<i>Ziziphora cilinopoidioides</i> Lam.	Ch	IT	
<i>Ziziphora tenuior</i> L.	Th	IT	
Linaceae			
<i>Linum tenuifolium</i> L.	He	IT	Ra,*
Malvaceae			
<i>Malva neglecta</i> Wallr.	He	IT, H	
<i>Malva sylvestris</i> L.	He	IT	
Onagraceae			
<i>Epilobium hirsutum</i> L.	He	IT, H	
<i>Epilobium minutiflorum</i> Hausskn.	Th	IT	
Orobanchaceae			
<i>Orobanche aegyptiaca</i> Pers	Th	IT, SS	
Papaveraceae			
<i>Glaucium grandiflorum</i> Boiss. & Huet.	He	IT	
<i>Hypecoum pendulum</i> L. var. <i>pendulum</i>	Th	IT, H, SS	
Fabaceae			
<i>Alhagi persarum</i> Boiss. & Buhse	He	IT, SS	
<i>Astragalus carmanicus</i> Bornm.	Ch	IT	En
<i>Astragalus cephalanthus</i> DC.	Ch	IT	En
<i>Astragalus commixtus</i> Bunge	Th	IT, SS	
<i>Astragalus dactylocarpus</i> Emend.	Ch	IT	*
<i>Astragalus glaucacanthos</i> Fischer	Ch	IT	En,*
<i>Astragalus gummifer</i> Labill.	Ch	IT	*
<i>Astragalus kirrindicus</i> Boiss.	He	IT	*
<i>Astragalus lycioides</i> Boiss.	Ch	IT	Ra,*
<i>Astragalus meimandicus</i> Massoumi & Vakili.	Ch	IT	En
<i>Astragalus microphysa</i> Boiss.	Ch	IT	En
<i>Astragalus porphyrophysa</i> Bornm. & Gauba	Ch	IT	En
<i>Astragalus ptychophyllus</i> Boiss.	He	IT	En,*

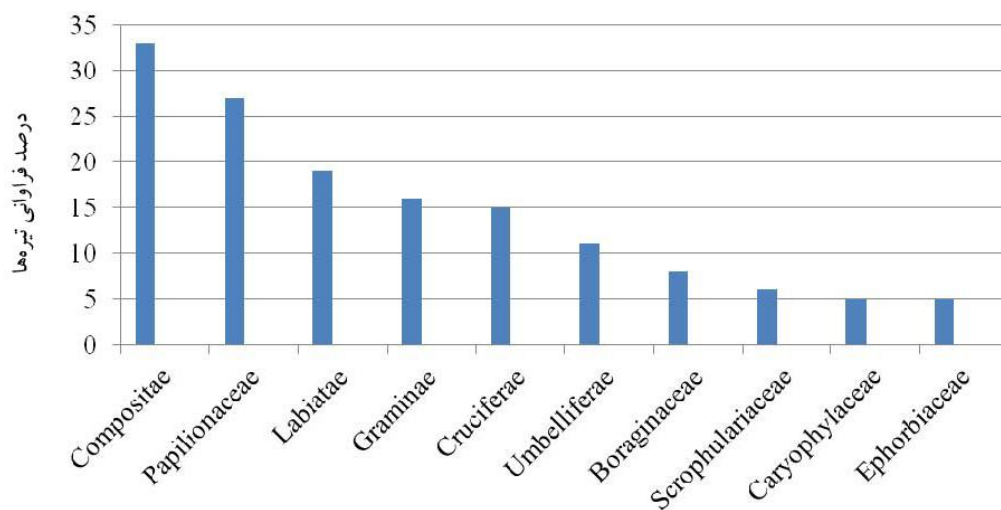
تاکسون	شکل زیستی	منطقه رویشی	بوم‌زاد، نادر، تک‌گونه‌ای
<i>Astragalus rhodosemius</i> Boiss.	Ch	IT	En
<i>Astragalus siliquosus</i> Boiss.	He	IT	
<i>Astragalus spachianus</i> Boiss.	He	IT	Ra
<i>Astragalus sparsus</i> Del.	Ch	IT	
<i>Cicer spiroceras</i> Jaub. & spach	He	IT	
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	He	IT, ES	
<i>Lathyrus inconspicuus</i> L.	Th	ES	
<i>Lotus corniculatus</i> L.	Th	ES	
<i>Medicago sativa</i> L.	He	IT, ES	
<i>Melilotus albus</i> Medicus.	He	IT, ES	
<i>Onobrychis aucheri</i> Boiss.	He	IT	En, Ra
<i>Sophora alopecuroides</i> L.	He	IT, ES	
<i>Trigonella monantha</i> C. A. Mey.	Th	IT	
<i>Vicia peregrina</i> L.	Th	IT, ES	
Plantaginaceae			
<i>Plantago lanceolata</i> L.	He	Cosm	
Plumbaginaceae			
<i>Acantholimon scorpius</i> Boiss.	Ch	IT	
Polygonaceae			
<i>Polygonum polycnemoides</i> Jaub. & Spach.	Th	IT	
<i>Pteropyrum aucheri</i> Jaub. & Spach.	Ph	IT, SS	
<i>Rheum ribes</i> L.	He	IT	
<i>Rumex pulcher</i> L.	He	ES	
Ranunculaceae			
<i>Adonis flammea</i> Jacq.	Th	IT, H	
<i>Consolida orientalis</i> (J. Gay) R. Schrödinger	Th	IT	
Resedaceae			
<i>Reseda lutea</i> L.	He	Cosm	
Rosaceae			
<i>Amygdalus scoparia</i> Spach.	Ph	IT	
<i>Cotoneaster luristanicas</i> Kotz	Ph	IT	
<i>Crataegus meyeri</i> Pojark.	Ph	IT	*
<i>Rosa moschata</i> J. Hermann.	Ph	IT	
Rubiaceae			
<i>Asperula laxiflora</i> Boiss.	He	IT	
<i>Galium humifusum</i> Bieb.	Th	IT	
<i>Callipeltis cucullaria</i> Stev.	Th	IT, ES	
Scrophulariaceae			
<i>Linaria</i> sp.	He	IT	
<i>Scrophularia gaubae</i> Bornm.	He	IT	En
<i>Verbascum kermanense</i> Hub. Mor.	He	IT	En, Ra
<i>Veronica anagallis-aquatica</i> L.	Th	ES	
<i>Veronica biloba</i> Schreb.	Th	IT	
<i>Veronica rubrifolia</i> Boiss. subsp. <i>repectatissima</i>	Th	IT	
Solanaceae			
<i>Hyoscyamus niger</i> L.	He	IT, H	*
<i>Hyoscyamus senecionis</i> Willd.	He	IT	
<i>Lycium depressum</i> Stocks.	Ph	IT	
<i>Solanum luteum</i> Miller.	Th	IT, SS	
Tamaricaceae			
<i>Tamarix ramosissima</i> Ladeb.	Ph	IT, SS	
Apiaceae			
<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm.	He	IT, H	*
<i>Bupleurum exaltatum</i> M. B.	He	IT, SS	
<i>Eryngium bungei</i> Boiss.	He	IT	
<i>Ferula ovina</i> (Boiss.) Boiss.	He	IT	

تاکسون	شکل زیستی	منطقه رویشی	بوم‌زاد، نادر، تک‌گونه‌ای
<i>Prangos cheilanthifolia</i> Boiss.	He	IT	En
<i>Prangos ferulacea</i> (L.) Lindl.	He	IT	*
<i>Scandix aucheri</i> Boiss.	Th	IT	*
<i>Scandix stellata</i> Banks & Soland.	Th	IT, SS	*
<i>Theocarpus meifolius</i> Boiss.	He	IT	En Mo,*
<i>Turgenia latifolia</i> (L.) Hoffm.	Th	IT, H	
<i>Zosima absinthifolia</i> Vent.	He	IT	
Urticaceae			
<i>Parietaria judaica</i> L.	He	Cosm	
<i>Urtica dioica</i> L. subsp. <i>dioica</i>	He	Cosm	
Valerianaceae			
<i>Valeriana sisymbriifolia</i> Vahl.	Th	IT	*
<i>Valerianella szowitsiana</i> Fisch & C.A.Mey.	Th	IT	
<i>Valerianella tuberculata</i> Boiss.	Th	IT	*
Verbenaceae			
<i>Verbena officinalis</i> L.	Th	IT, H	
Zygophyllaceae			
<i>Peganum harmala</i> L. var. <i>harmala</i>	He	Cosm	
Monocotyledones			
Amaryllidaceae			
<i>Ixiolirion tatricum</i> (Pall.) Herb.	Ge	Cosm	Mo
Poaceae			
<i>Aegilops triuncialis</i> L.	He	IT, SS	
<i>Alopecurus arundinaceus</i> Poir.	Ge	IT, H, SS	
<i>Boiss.iera squarrosa</i> (Banks & Sol.) Eig	Th	IT	Mo
<i>Bromus danthoniae</i> Trin. var. <i>danthoniae</i>	Th	IT, H, SS	
<i>Bromus sterilis</i> L.	He	IT, H, SS	
<i>Eremopyrum bonaepartis</i> (Spreng.) Nevski	Th	IT,SS	
<i>Eremopyrum distans</i> (C. Koch) Nevski.	Th	IT, H, SS	
<i>Melica Jaucquemontii</i> Decne. ex Jacquem.	Ge	IT, H, SS	
<i>Nardurus maritimus</i> (L.) Murb.	Th	IT, SS	
<i>Oryzopsis lateralis</i> (Regel) stapf	He	IT, H, SS	
<i>Poa bulbosa</i> L.	Ge	IT, H, SS	
<i>Poa nemoralis</i> L.	He	IT, H	
<i>Polypogon fugax</i> Nees. ex Steud.	Th	IT,SS	
<i>Psathyrostachys fragilis</i> (Boiss.) Nevski.	Ch	IT	Mo
<i>Stipa barbata</i> Desf.	Ge	IT, H, SS	
<i>Taeniatherum crinitum</i> (Schreb.) Nevski.	He	IT,SS	
Iridaceae			
<i>Iris songarica</i> Schenk in Fisch.	Ge	IT,H	
Liliaceae			
<i>Allium ampeloprasum</i> L.	Ge	IT	
<i>Allium rubellum</i> M.B.	Ge	IT	
<i>Eremurus lutens</i> Beker.	Ge	IT	
<i>Muscari comosum</i> (L.) Miller.	Ge	IT, ES	

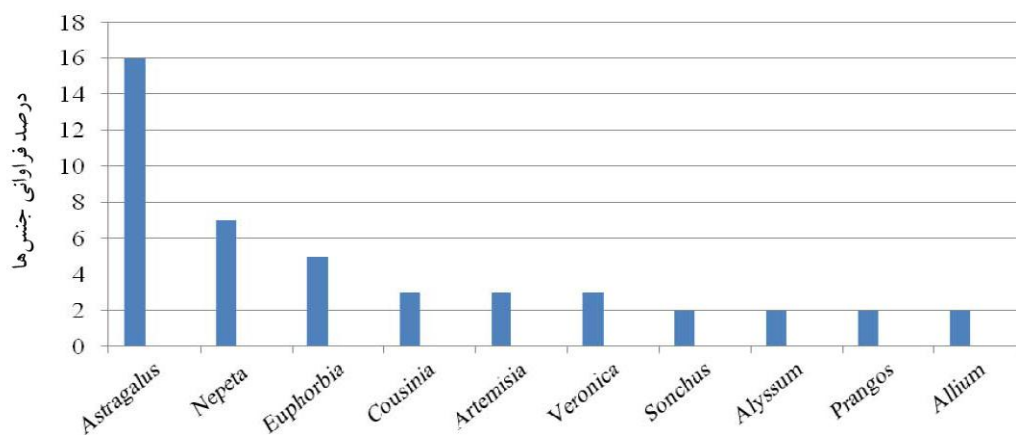


شکل ۲- درصد فراوانی تیره‌ها، جنس‌ها و گونه‌ها در منطقه و ایران

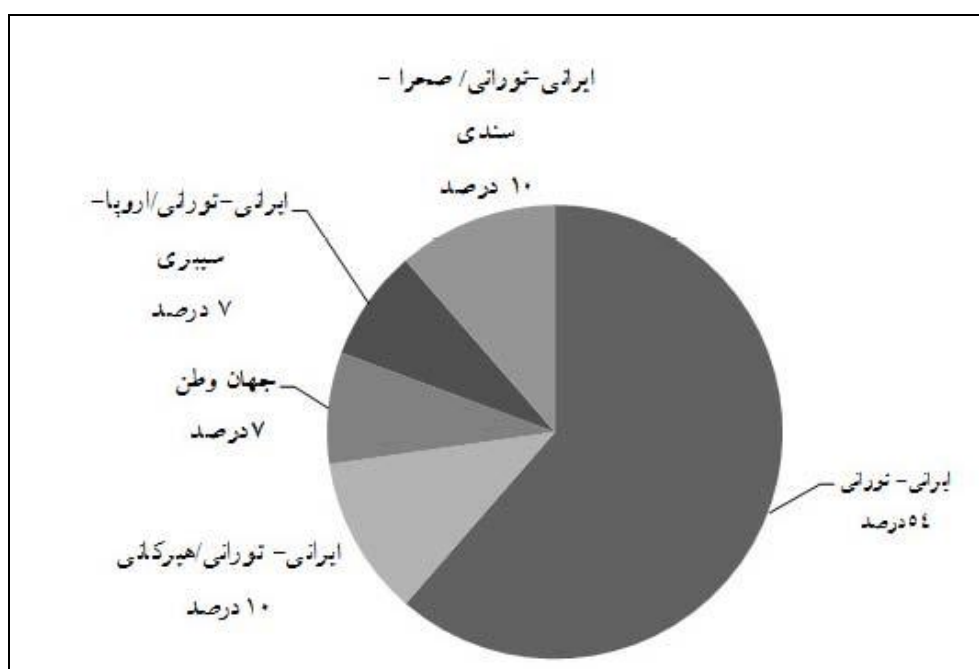
شکل ۳- درصد فراوانی شکل‌های زیستی گیاهان منطقه



شکل ۴- درصد فراوانی تیره‌هایی که بیشترین تعداد گونه را دارند



شکل ۵- درصد فراوانی جنس‌هایی که بیشترین تعداد گونه را دارند



شکل ۶- درصد فراوانی انتشار جغرافیایی گیاهان منطقه

منابع

- اسدی و همکاران. (۱۳۶۷-۱۳۸۷) فلور ایران. شماره‌های ۱-۵۷، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران.
- بیگلری، ح. (۱۳۸۵) طرح هادی روستای ریسه دهستان پاقلعه شهرستان شهربابک. بنیاد مسکن شهرستان شهربابک، شهربابک.
- حسن آبادی، ز. (۱۳۸۳) مطالعه فلور منطقه جوزم شهربابک. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهیدباهنر کرمان، کرمان، ایران.
- قهرمان، ا. (۱۳۶۲-۱۳۸۲) فلور رنگی ایران. جلد‌های ۴-۲۵. انتشارات طرح مشترک مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع و دانشگاه تهران، تهران.
- قهرمان، ا. و عطار، ف. (۱۳۷۷) تنوع زیستی گونه‌های گیاهی ایران. جلد اول، انتشارات دانشگاه تهران، تهران.
- مبین، ص. (۱۳۵۴-۱۳۷۴) رُستنی‌های ایران. جلد‌های ۱-۴. انتشارات دانشگاه تهران، تهران.
- مظفریان، و. (۱۳۷۳) رده‌بندی گیاهی. جلد‌های اول و دوم، انتشارات امیر کبیر، تهران.
- معصومی، ع. ا. (۱۳۶۵-۱۳۸۵) گون‌های ایران. جلد‌های ۱-۵، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران.
- معصومی، ع. ا. و کیلی، م. ع. (۱۳۸۱) گونه‌های جدید و جالب توجه از جنس گون در ایران. مجله گیاه‌شناسی ایران ۱۷: ۱۰-۱۱.
- میرتاج‌الدینی، م. (۱۳۷۵) بررسی فلورستیک و جوامع گیاهی منطقه چشمه سبز (گوغر) شهرستان بافت. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- وکیلی، م. ع. (۱۳۷۸) بررسی اکوفیتوسوسیولوژیکی منطقه میمند شهربابک، رساله دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، تهران، ایران.

-
- Rechinger, K. H. (1963-1998) *Flora Iranica*. 1-173. Akademische Druck und Verlagsanstalt, Graz.
- Zohary, M. (1973) *Geobotanical foundation of Middle East*. Gustav Fischer Verlag, Amsterdam.

جداسازی و شناسایی باکتری‌های پلی‌اکستریموفیل قلیادوست، نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک تالاب قلیایی شور-دریایی گمیشان

آزاده شاهین‌پی^۱، محمد علی آموزگار^{۲*} و عباس اخوان سپهی^۴

^۱ بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

^۲ بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۳ بانک میکروارگانسیم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، کرج، ایران

^۴ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

چکیده

تالاب گمیشان یک اکوسیستم طبیعی در ۳۵ کیلومتری شمال غربی گرگان، در جوار غربی شهر خواجه نفس و گمیشان واقع است. نمونه برداری از سه موقعیت جغرافیایی مختلف، در دو نوبت فصل خشک و بارش، منجر به جداسازی ۲۲۴ جدایه شد. از بین جدایه‌ها، ۵۷ سویه برای بررسی رفتارهای نمک‌دوستی و تحمل‌کنندگی نمک و همچنین، بهینه و محدوده رشد در اسیدیته و دماهای مختلف بررسی شدند. بیشتر سویه‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک قادر به رشد بهینه در اسیدیته ۸/۵-۹ بودند و محدوده دمای رشد ۰-۴۰ درجه سانتیگراد را نشان دادند. سویه‌ها از نظر تولید آنزیم‌های هیدرولازی مطالعه شدند. فعالیت لیپازی در اغلب جدایه‌ها مشاهده شد و به ترتیب ۱۵، ۷ و ۳ سویه از کل سویه‌ها آمیلاز، پروتئاز و DNase تولید کردند. این آنزیم‌ها در برخی فرآیندهای صنعتی می‌تواند سودمند باشد. بررسی فیلوژنتیک ترادف 16S rDNA برای ۵۵ سویه انجام شد. این سویه‌ها از نظر فیلوژنتیک در ۲۲ جنس مختلف *Bacillus*، *Altererythrobacter*، *Aeromicrobium*، *Achromobacter*، *Caenispirillum*، *Cyclobacterium*، *Erythrobacter*، *Halomonas*، *Halobacillus*، *Jonesia*، *Idiomarina*، *Rheinheimera*، *Pseudomonas*، *Planococcus*، *Paenibacillus*، *Nesiotobacter*، *Marteella*، *Marinobacter* و *Saccharospirillum*، *Stappia*، *Thalassospira* و *Vibrio* قرار گرفتند. ۲۳ درصد از این سویه‌ها باکتری‌های نمک‌دوست قلیادوست بودند که به جنس‌های *Bacillus*، *Halobacillus*، *Halomonas*، *Idiomarina* و *Marinobacter* تعلق داشتند. این بررسی، نخستین مطالعه بر روی باکتری‌های قابل کشت تالاب گمیشان، یک اکوسیستم قلیایی شور-دریایی مهم، است.

واژه‌های کلیدی: تالاب گمیشان، تحمل‌کننده نمک، نمک‌دوست، 16S rDNA

مقدمه

تالاب بین‌المللی گمیشان نوار نسبتاً باریکی است که با برای شمالی-جنوبی در امتداد سواحل شرقی دریای خزر قرار گرفته است. این تالاب تقریباً از دو کیلومتری شمال شهر گمیشان آغاز شده و تا مرز ترکمنستان و فراسوی آن یعنی تا هشت کیلومتر در خاک ترکمنستان نیز ادامه پیدا می‌کند. مساحت آن بیست هزار هکتار و ارتفاع آن ۲۷ متر پایین‌تر از سطح آب‌های آزاد است. این تالاب به لحاظ هم‌پیوندی با دریای خزر (حاشیه اقلیمی معتدل) در کنار یک اقلیم خشک، ایجاد میکرواقلم‌هایی می‌کند که تبعات زیستگاهی با ارزشی را به ارمغان آورده است. کلر و سدیم بیشترین یون‌های موجود در تالاب بوده که تأییدی بر تقسیم‌بندی تالاب در گروه دریاچه‌های تالازوهالین است. مقدار نمک دریاچه ۳-۵ درصد و متوسط اسیدیته آن ۸/۸ است (بهروزی‌راد، ۱۳۸۶). هدف اصلی در اکولوژی میکروبی درک تنوع میکروبی در زیستگاه‌های طبیعی است. بنابراین، شناخت ما از میکروارگانیسم‌ها و همچنین زیستگاه‌ها ضروری است (Grant, 1992). توزیع و فراوانی نوع خاصی از محیط‌های افراطی برای تعیین رتبه و ویژگی زیوگان (biota) بسیار مهم است (Rodriguez-Valera, 1993). مهم‌ترین اکوسیستم‌های پرشور که تاکنون بررسی شده است شامل دریاچه بزرگ شور ایالت یوتا آمریکا، دریای مرده، شورابه‌های به شدت قلیایی وادی ناترون مصر و دریاچه ماگادی (Magadi) کنیا هستند (Oren, 1994; Kamekura, 1998, 2002a). دریاچه‌های پرشور آران و بیدگل، ارومیه و حوض سلطان در ایران نیز اکوسیستم‌های با اهمیتی هستند که از نظر تنوع میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست بررسی شده‌اند

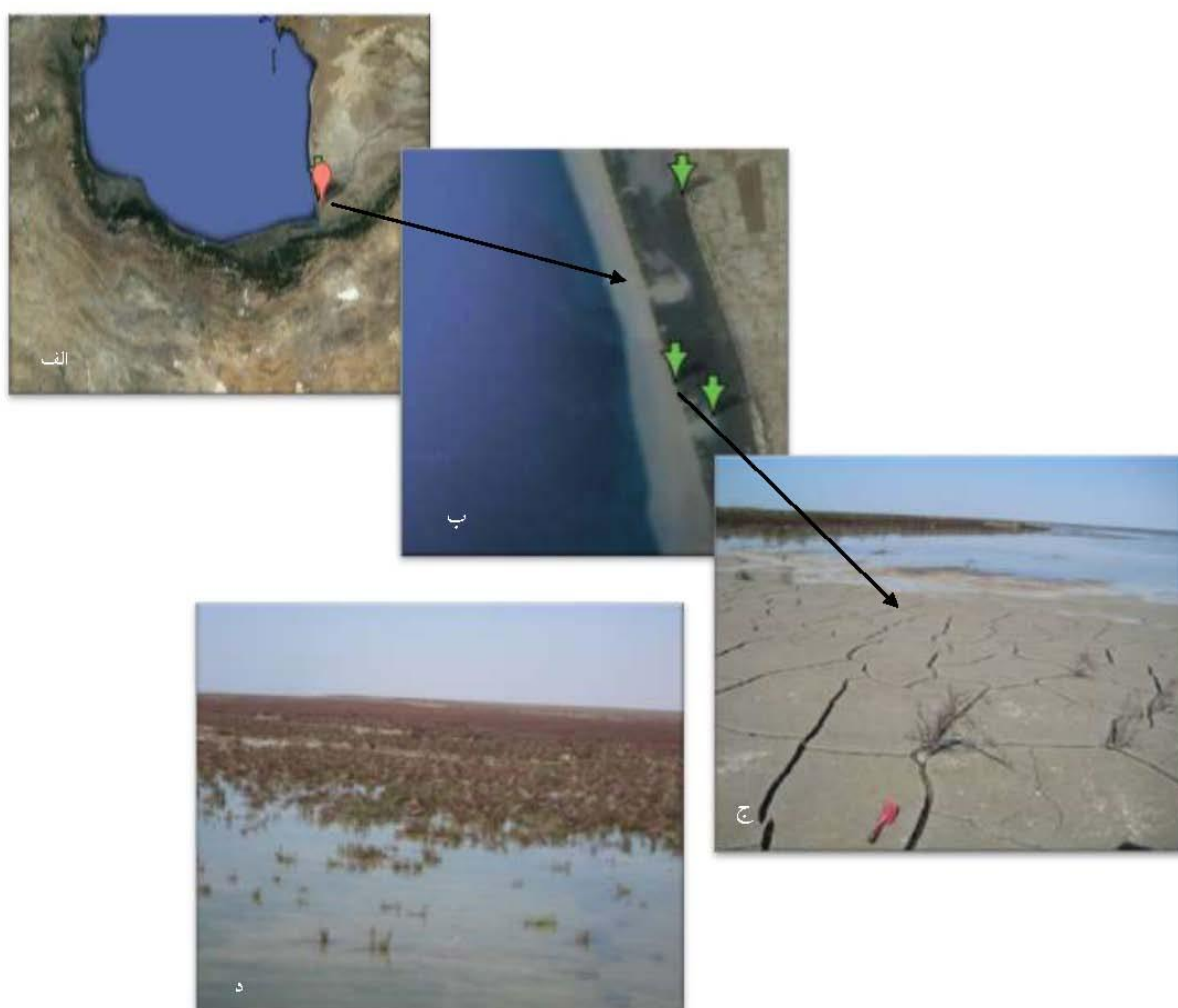
(Makhdoumi Kakhki et al., 2009; Rohban et al., 2012). محیط‌های پرشور به علت سختی شرایط، تنوع میکروبی کمتری نسبت به محیط‌های معمولی دارند، اما تنوع فیلوژنتیک میکروارگانیسم‌هایی که در غلظت‌های بالای نمک زندگی می‌کنند، شگفت‌انگیز است. تنوع متابولیسمی نمک‌دوست‌ها نیز به همان اندازه قابل توجه است (Oren, 2002b). آنها مدل‌های ارزشمندی برای بررسی مولکولی سازگاری اسمزی پروکاریوتی هستند که پتانسیل کاربرد در زیست‌فناوری و میکروبیولوژی کاربردی را دارند (Kushner and Kamekura, 1988). به طور طبیعی محیط‌هایی با مقادیر اسیدیته بالا که رشد میکروبی را حمایت می‌کنند در بسیاری از اکوسیستم‌ها پراکنده شده‌اند. اغلب ارگانیسم‌های در حال رشد در این محیط‌ها مقادیر اسیدیته به مراتب بالاتر از خنثی را تجربه می‌کنند. ارگانیسم‌هایی که در محیط‌های بسیار قلیایی زیست می‌کنند، ارائه‌دهنده سازگاری‌های گسترده فرآیندهای زیستی برای غلبه بر شرایط مختلف محیطی هستند (Ulukanli, 2002). هدف از این پژوهش، بررسی تنوع زیستی باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک ساکن در تالاب قلیایی شور-دریایی گمیشان و نیز امکان دستیابی به جنس، گونه یا سویه جدید از میکروارگانیسم‌های بومی این منطقه است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها از سه موقعیت تالاب (مناطق شمال شرقی (A)، جنوب شرقی (B) و جنوب غربی تالاب (C)) در دو فصل خشک و بارش به ترتیب در شهریور و بهمن ماه سال ۱۳۸۹ جمع‌آوری شد. طول و عرض جغرافیایی دقیق مناطق نمونه‌برداری توسط GPS ثبت و روی

منطقه بود. نمونه‌ها در دمای محیط و در طی یک روز به آزمایشگاه منتقل و میزان شوری آنها نیز اندازه‌گیری شد. آنالیز شیمیایی آب تالاب برای سنجش عناصر موجود در محیط‌زیست طبیعی باکتری‌های این اکوسیستم و به کارگیری آن در طراحی محیط کشت مناسب که امکان جداسازی طیف گسترده‌تری از باکتری‌ها را فراهم سازد، توسط شرکت خاک بهین آزما صورت گرفت.

تصویر ماهواره‌ای علامت‌گذاری شد (شکل ۱). نمونه‌های مختلف جمع‌آوری شده از هر منطقه درون کیسه‌های پلاستیکی و لوله‌های فالدکون استریل ریخته شد و دما، اسیدیته و میزان ذرات جامد محلول در آب (Total Dissolved Solids) نمونه‌ها به ترتیب با دماسنج، pH متر و TDS متر قابل حمل در محل اندازه‌گیری و ثبت شد. انتخاب این مناطق بر اساس نقاط قابل نمونه برداری تالاب و ویژگی‌های ظاهری هر



شکل ۱- الف) موقعیت تالاب گمیشان در نقشه ایران، ب) موقعیت سه نقطه نمونه برداری (earth.google.com)، ج) جنوب غربی (منطقه باتلاقی) د) گیاهان شورپسند غوطه‌ور در آب تالاب

نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک از محیط کشت مارین آگار (MA, Marine agar) با ترکیبات زیر استفاده شد

متعاقباً نگهداری نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد صورت گرفت. برای جداسازی باکتری‌های

شد. تمام محیط‌های فوق در دماهای ۳۴ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. تمامی کلونی‌های رشد یافته روی محیط‌های جامد پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و همچنین، به منظور جداسازی کلونی‌های کند رشد تا شش ماه پس از گرماگذاری روی محیط‌های جامد مشابه، جداسازی و خالص شد. خالص‌سازی سویه‌ها، پس از رشد و ظاهر شدن کلونی، حتی‌المقدور از تک کلونی‌ها کشت خالص به عمل آمد (Caton, 2004). برای تأیید خالص بودن کلونی‌ها رنگ‌آمیزی گرم بر اساس روش Hucker انجام شد (Gerhardt and Murray, 1994). به منظور تسهیل بررسی جدایه‌ها از نمونه‌های مختلف، سویه‌ها خالص شده بر مبنای مکان جدا شده، نوع نمونه و همچنین نوع محیط کشت استفاده شده به صورت زیر نام‌گذاری شدند:

A: مکان A، B: مکان B، C: مکان C، G: تالاب گمیشان، P: نمونه گیاهی، F: رسوبات، S: خاک، W: آب، (Marine agar) X: محیط مارین آگار؟، Y: محیط (Modified Alkalophilic Halophile agar) تغییر یافته هالوفیل آلکالوفیل آگار.

بررسی خصوصیات فنتوتیپی و بیوشیمیایی تمامی سویه‌ها با استفاده از روش Simbert و Krieg (۱۹۹۴) انجام شد.

برای افتراق باکتری‌های نمک دوست و تحمل‌کننده نمک از محیطی با ترکیب زیر استفاده شد ($g\ l^{-1}$):

Yeast extract, 5; SW medium: NaCl, 234; MgCl₂.6H₂O, 39; CaCl₂, 1; MgSO₄.7H₂O, 61; KCl, 6; NaHCO₃, 0.2; KBr, 0.7

محیط SW با غلظت نمکی ۳۰ درصد تهیه شد و به نسبت‌های متفاوت برای درصدهای نمکی ۰ تا ۲۵ به محیط پایه اضافه شد. اسیدیته محیط ۸/۵ تنظیم شد. در

($g\ l^{-1}$)

NaCl, 19.45; MgCl₂, 8.8; Peptone, 5.0; Na₂SO₃, 3.24; CaCl₂, 1.8; Yeast extract, 1; KCl, 0.55; NaHCO₃, 0.16; Ferric Citrate, 0.1; KBr, 0.08; H₃BO₃, 0.02; Na₂HPO₄, 8.0 mg; NaF, 2.4 mg; NH₄NO₃, 1.6 mg; Agar, 15.0; Distilled water, 1000ml

اسیدیته محیط ۷/۵ تنظیم شد (Ronald, 2005). برای کشت و جداسازی احتمالی باکتری‌های نمک دوست قلیادوست و تحمل‌کننده قلیا از محیط کشت MAHA (Modified Alkalophilic Halophile Agar) استفاده شد. مقدار نمک این محیط ۵ درصد در نظر گرفته شد و اسیدیته آن ۹/۵ تنظیم شد. برای ایجاد شرایط قلیایی مجموعاً ۱۹ گرم در لیتر از Na₂CO₃, 10.6 و NaHCO₃, 8.42 استفاده شد (Ronald, 2005) ($g\ l^{-1}$):

NaCl, 30.0; Peptone, 5.0; Yeast extract, 2.0; Meat extract, 1.0; Tri-Sodium Citrate, 0.12; KCl, 0.08; MgSO₄.7H₂O, 0.04; FeSO₄.7H₂O, 2.0 mg; MnCl₂.4H₂O, 0.36 mg; Agar, 15.0; Distilled water, 1000ml

برای بررسی میکروارگانیزم‌ها در سیستم‌های طبیعی - بر حسب تعداد کل، تعداد جوامع خاص یا فعالیت‌های متابولیکی آنها - نمونه‌های شاخص آنالیز شد و نتایج آن به کل جامعه تعمیم داده می‌شوند. نمونه باید نمایان‌گر تنوع و تراکم موجودات در کل محیط نمونه‌برداری باشد. برای مثال نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مکان A با هم مخلوط شده و به عنوان نمونه شاخص در نظر گرفته شد (Atlas and Bartha, 1998) سپس، از این نمونه‌های شاخص سری رقت متوالی تهیه و در محیط‌های تعریف شده کشت

آنزیم آمیلاز از محیط کشت با ترکیب زیر استفاده شد
($g\ l^{-1}$):

Soluble starch, 10; Beef extract, 3; Agar, 15

پس از رشد در محیط، لوگل (یدید پتاسیم)، بر روی محل رشد باکتری اضافه شد. ایجاد هاله شفاف نشانه تولید آنزیم خارج سلولی آمیلاز و هیدرولیز نشاسته در برون سلول است (Amoozegar *et al.*, 2003).

تولید خارج سلولی پروتئاز: برای بررسی تولید

آنزیم پروتئاز، از یک محیط کشت با ترکیب زیر استفاده شد ($g\ l^{-1}$):

Meat extract, 3; Peptone, 5; Skim milk, 20; Agar, 15

وجود هاله شفاف در اطراف کلونی‌ها پس از دو هفته گرماگذاری نشانه هیدرولیز پروتئین کازئین بوده، به عنوان پاسخ مثبت در نظر گرفته شد (Amoozegar *et al.*, 2008).

تولید خارج سلولی لیپاز: برای بررسی هیدرولیز

توئین ۸۰ از محیط کشت زیر استفاده شد ($g\ l^{-1}$):

Peptone, 10; Tween80, 10; $CaCl_2.H_2O$, 0.1;

Agar, 15

ایجاد نواحی رسوب اطراف کلونی‌ها به صورت دانه‌های سفید همراه با هاله کدر، نشان‌دهنده تولید آنزیم لیپاز توسط باکتری است. به تناسب ضعف و قوت آنزیم لیپاز گستردگی محوطه رسوب کمتر یا بیشتر شد (Martin *et al.*, 2003).

تولید خارج سلولی داکسی‌ریبونوکلئاز: برای

بررسی فعالیت داکسی‌ریبونوکلئازی سویه‌ها از محیط داکسی‌ریبونوکلئاز تست-آگار به میزان ۴۰ گرم در لیتر استفاده شد. برای تشخیص بهتر، مقدار ۰/۰۰۰۸

شیکر انکوباتور با دمای ۳۴ درجه سانتیگراد و ۱۵۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. سویه‌هایی که علاوه بر توانایی رشد در محیط فاقد نمک دارای رشد بهینه در کمتر از ۳ درصد نمک (معادل غلظت نمک دریا) بودند، به عنوان سویه‌های تحمل‌کننده نمک و آن دسته که بهینه رشد در بالای ۳ درصد نمک داشتند و قادر به رشد در محیط فاقد نمک نبودند به عنوان نمک‌دوست در نظر گرفته شدند و محدودده رشد نمک در این باکتری‌ها تعیین گردید.

برای بررسی محدودده اسیدیته رشد و نیز میزان بهینه آن از محیط‌های مایع با ترکیب زیر استفاده شد ($g\ l^{-1}$):

Nutrient broth, 8; NaCl, 30; HEPES, 50mM; CAPS, mM

از بافر HEPES در دامنه اسیدیته ۴ تا ۹ و برای اسیدیته بالاتر ۱۰ و ۱۱ از بافر CAPS در محیط‌ها استفاده شد. اسیدیته محیط‌ها پیش از اتوکلاو در بازه بین ۴ تا ۱۱ با فاصله‌های ۱ و نیم واحدی تنظیم شد و پس از اتوکلاو نیز تأیید شد.

برای بررسی محدودده دمای رشد از محیط کشت نوترینت آگار برای دماهای ۵ تا ۱۰ درجه سانتیگراد و نوترینت برات برای دماهای بین ۱۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد استفاده شد و میزان اسیدیته بر روی ۸/۵ تنظیم شد. برای هر یک از سویه‌های انتخاب شده میزان مورد نیاز از نمک NaCl نیز اضافه شد.

فعالیت آنزیم‌های هیدرولازی: این بررسی تنها

روی سویه‌های منتخب برای مطالعه فیلوژنتیک صورت گرفت. در این مرحله سنجش به روش پلیت انجام گردید. محیط‌ها همگی دارای ۳ درصد NaCl بودند و اسیدیته آنها ۸/۵ تنظیم شد (Rohban *et al.*, 2009).

تولید خارج سلولی آمیلاز: برای بررسی تولید

درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۵ میکرولیتر از محصول PCR به همراه شاهد مثبت و منفی PCR و شاخص وزن مولکولی با طیف ۱۰۰-۱۰۰۰۰ bp روی ژل آگاروز ۰/۵ تحلیل شد و برای ترادف‌خوانی به شرکت ماکروژن در کره جنوبی فرستاده شد. ترادف‌های به دست آمده با نرم‌افزار Chromas Pro مرتب شده، با نرم‌افزار BLAST با توالی‌های ثبت شده موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی GenBank و Eztaxon مقایسه شد. به این ترتیب، نزدیک‌ترین سویه‌ها با ترادف 16S rRNA مشابه با سویه‌های منتخب PCR شده تعیین شد. تحلیل فیلوژنتیک باکتری‌های منتخب با سویه‌های نزدیک به آنها با نرم‌افزار ClustalX (نسخه ۲/۰) انجام شد. بررسی ارتباط فیلوژنتیکی توالی‌های به دست آمده با یکدیگر و دیگر سویه‌ها توالی‌های مرتبط به دست آمده حاصل از جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی Genbank و Eztaxon با نرم‌افزار MEGA (نسخه ۵/۰) درخت فیلوژنتیک با الگوریتم‌های Maximum likelihood، Neighbour-joining و Maximum parsimony نیز رسم گردید (Tamura and Dudley, 2007). بررسی اعتبار شاخه‌های درخت با الگوریتم bootstrap analysis و با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری صورت گرفت. توالی‌های به دست آمده در این پژوهش در بانک ژنی NCBI ثبت و شماره ژنی مربوط به هر توالی دریافت گردید.

نتایج

بررسی‌های فیزیوشیمیایی: اطلاعات مربوط به مشخصات فیزیوشیمیایی نمونه‌ها در جدول ۱ آورده شده است. در نمونه‌گیری شهریور ماه بیشترین دما مربوط به منطقه C یعنی ۳۵ درجه سانتیگراد است،

گرم در لیتر تولوئیدن بلو به محیط فوق اضافه شد. پس از رشد از کلریدریک اسید یک نرمال به عنوان معرف استفاده شد. مشاهده هاله روشن‌تر در اطراف رشد به عنوان پاسخ مثبت گزارش شد.

تکنیک 16S rRNA توسط واکنش زنجیره‌ای

پلیمراز: برای استخراج DNA باکتری‌ها از روش دست‌ورزی شده استخراج DNA پیشنهاد شده توسط Marmur در سال ۱۹۹۴ استفاده شد.

برای تکثیر ژن 16S rRNA از پرایمرهای عمومی (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 27F و (5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT) 1492R استفاده شد (Spencer, et al., 2004). غلظت مواد به کار رفته در تهیه مخلوط واکنش زنجیره پلیمراز برای حجم واکنش ۵۰ میکرولیتر به این صورت است: PCR buffer (10X), 50µl; MgCl₂ (5 mM), 1.5µl; dNTP mix (10 mM), 1 µl; Primers (10 µM each), 1.25µl; Taq DNA polymerase, 0.25 µl; Template DNA, 2-3µl; Sterilized distilled water, 38-39µl

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با این روش صورت گرفت: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. چرخه تکثیر شامل ۳۰ سیکل تکرار شونده با دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتیگراد (دمای اتصال پرایمرها برحسب سویه‌های مختلف متفاوت بود، لذا، برای بهینه‌سازی دمای اتصال هر سویه از روش گرادیان استفاده شد) به مدت ۴۵ ثانیه و دمای سنتز ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵-۵۰ ثانیه بود. پس از اتمام چرخه‌ها و به منظور تکمیل نهایی ساختار DNA تکثیر شده، نمونه‌ها به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲

منطقه دیگر بالاتر است. در نمونه‌های خاک نیز میزان شوری و TDS در هر سه مکان نمونه‌گیری در فصل خشک نسبت به فصل بارش بیشتر گزارش شد. جدول ۱ نتیجه سنجش غلظت برخی از آنیون‌ها و کاتیون‌های مهم موجود در ساختار نمک تالاب را نشان می‌دهد.

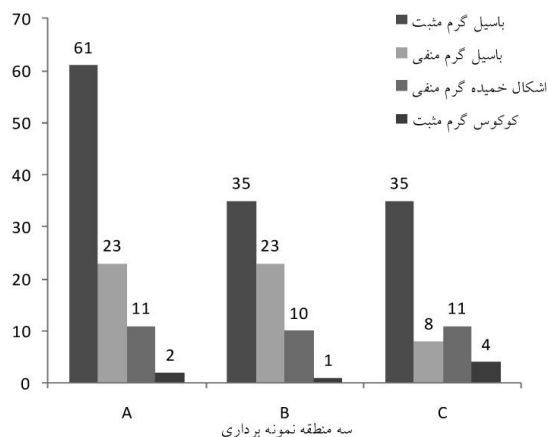
شوری آب این منطقه حدود ۳۶ گرم بر لیتر برآورد شد، که نسبت به دو منطقه دیگر بالاتر بود. با توجه به بستر جلبکی این تالاب، اسیدیته قلیایی آن قابل توجه است. این بستر در منطقه جنوب شرقی وسعت بالاتری دارد و به همان نسبت اسیدیته این منطقه نسبت به دو

جدول ۱- مشخصات فیزیکوشیمیایی نمونه‌های آب و خاک در دو نوبت نمونه‌گیری و غلظت برخی از یون‌های مهم نمونه آب از تالاب گمیشان

فصل بارش				فصل خشک			
شوری (g l ⁻¹)	TDS (g l ⁻¹)	دما (°C)	اسیدیته	شوری (g l ⁻¹)	TDS (g l ⁻¹)	دما (°C)	اسیدیته
۹/۴۲	۸/۰۷	۸	۷/۶	۲۶/۲۵	۲۳/۵	۲۷/۳	۸/۸۴
۴/۸۰	۴/۲۶	۹/۳	۸/۴۴	۲۷/۱۶	۲۱/۳	۳۳/۴	۹/۴۲
۱۹/۸	۱۵/۴۷	۸/۱	۸/۱۶	۳۵/۹۵	۲۶/۷	۳۵/۳	۷/۶۰
شوری (g l ⁻¹)				شوری (g l ⁻¹)			
TDS (g l ⁻¹)				TDS (g l ⁻¹)			
بر حسب محلول ۱۰۰ (m)				بر حسب محلول ۱۰۰ (m)			
مولال خاک				مولال خاک			
۰/۸۳		۸۵۷mg/l		۸/۱۴		۷/۰۴	
۲/۱۴		۲/۰۴		۲/۳۸		۲/۲۴	
۱/۵۷		۱۵۳۱mg/l		۱۰/۸۲		۹/۱۶	
Cl	۱۴۴۶۷/۶۷	Mg	۱۹۲۱/۲۸	K	۱۹۶/۹۱	Mn	۰/۱
Na	۹۷۳۰/۱۵	Ca	۷۲۹/۴۵	Zn	۱۴/۸۵	Ni	۰/۰۲۵
SO ₄	۵۱۰۷	HCO ₃	۲۷۴/۵۴	Fe	۵/۰۱	Cu	۰/۰۱

معادل با ۶۶ سویه از محیط قلیایی جدا شد. در میان مناطق نمونه برداری، منطقه A با ۹۷ و منطقه B با ۶۹ جدایه، بیشترین و منطقه C با ۵۸ کمترین تعداد جدایه را داشت. در شکل ۲ رابطه بین مناطق مختلف نمونه برداری و نوع جدایه‌ها بر مبنای رنگ آمیزی گرم نشان داده شده است. تفکیک کل جدایه‌ها بر اساس رنگ آمیزی گرم نشان داد که باسیل‌های گرم مثبت غیررشته‌ای با تعداد ۱۳۱ جدایه و پس از آن باسیل‌های گرم منفی با ۵۴ جدایه بیشترین تعداد و اشکال خمیده گرم منفی با ۳۲ جدایه و کوکوس‌های گرم مثبت با ۷ جدایه با فراوانی بسیار کمتری جداسازی شد.

تنوع میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از تالاب گمیشان: از نمونه‌های مختلف جمع‌آوری شامل شورابه‌ها، خاک، رسوبات و گیاهان در مجموع، ۲۲۴ باکتری جدا شد. از این تعداد، ۱۶۴ سویه مربوط به نمونه‌گیری در فصل خشک و ۶۰ سویه در رابطه با نمونه‌گیری در فصل بارش است. متوسط میزان کلونی‌های به دست آمده در روش کشت (شمارش زنده) در دو نوبت نمونه‌گیری در هر منطقه در نمونه‌های آب و خاک محاسبه شد و نتایج آن در جدول ۲ آمده است. بیشترین تعداد جدایه از محیط MA دارای اسیدیته ۷/۵ بود. شایان ذکر است که حدود ۲۹/۵ درصد کل جدایه‌ها



شکل ۲- فراوانی باکتری‌های جدا شده از سه نقطه نمونه برداری و نوع جدایه‌های هر منطقه بر اساس رنگ آمیزی گرم

افتراق سویه‌های نمک‌دوست نسبی و

تحمل‌کننده نمک: از مجموع ۵۷ سویه منتخب، ۶۳/۲ درصد آنها نمک‌دوست نسبی و ۳۶/۸ درصد سویه‌ها تحمل‌کننده نمک بودند.

در بین سویه‌های نمک‌دوست نسبی که رشد بهینه خود را در محیط ۳-۱۵ درصد نمک دارند، در برخی سویه‌ها رشد در ۲۵ درصد نمک هم مشاهده شد. سویه‌هایی که رشد بهینه در محیط‌های پایین‌تر از ۳ درصد نمک داشتند و همچنین، توانایی رشد در محیط فاقد نمک به عنوان باکتری‌های تحمل‌کننده نمک انتخاب شدند. در باکتری‌های تحمل‌کننده نمک رشد بهینه در محیط حاوی ۱ درصد نمک مشاهده شد. درصد سویه‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک به تفکیک مناطق جداسازی آنها در شکل ۳ آمده است. در هر سه منطقه میزان جدایه‌های نمک‌دوست نسبی نسبت به تحمل‌کننده نمک بیشتر است.

جدول ۲- شمارش زنده در دو نوبت نمونه برداری از آب و خاک

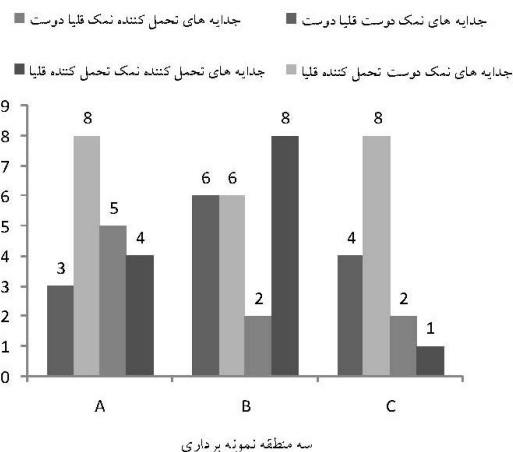
فصل بارش		مناطق نمونه برداری
متوسط میزان کلونی‌های به دست آمده CFU/ml		
آب	خاک	
$2/5 \times 10^3$	$2/5-7/2 \times 10^6$	منطقه جنوب غربی (A)
$2/9 \times 10^3$	$2/2-7/2 \times 10^6$	منطقه جنوب شرقی (B)
$2/9 \times 10^4$	$1/9-3/2 \times 10^6$	منطقه شمال شرقی (C)
فصل خشک		مناطق نمونه برداری
متوسط میزان کلونی‌های به دست آمده CFU/ml		
آب	خاک	
$1/2-8/8 \times 10^3$	$1/4-3/2 \times 10^7$	منطقه جنوب غربی (A)
$2/3 \times 10^4$	$1/5-6/8 \times 10^6$	منطقه جنوب شرقی (B)
$2/2-4/8 \times 10^4$	$1/5-6 \times 10^6$	منطقه شمال شرقی (C)

باسیل‌های گرم مثبت، باسیل‌ها و اشکال خمیده گرم منفی و کوکوس‌های گرم مثبت به ترتیب ۵۸/۵، ۳۸/۴ و ۳/۱ درصد از جدایه‌های را در بر گرفتند. همچنین، مشاهده لام رنگ آمیزی اسپور نشان داد که بیش از ۵۰ درصد باسیل‌های گرم مثبت اسپوردار بودند. در نهایت، بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی بررسی شده، سویه‌ها به چندین گروه تقسیم و در هر گروه سویه‌هایی با خصوصیات بسیار مشابه قرار داده شد. سپس، از میان این گروه‌ها ۵۷ سویه به صورت تصادفی برای مطالعات بیوشیمیایی بیشتر انتخاب گردید. از این ۵۷ سویه، ترادفیابی 16S rRNA برای ۵۵ سویه صورت گرفت. جدول ۳ ویژگی‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی برای ۵۷ سویه را نشان می‌دهد.

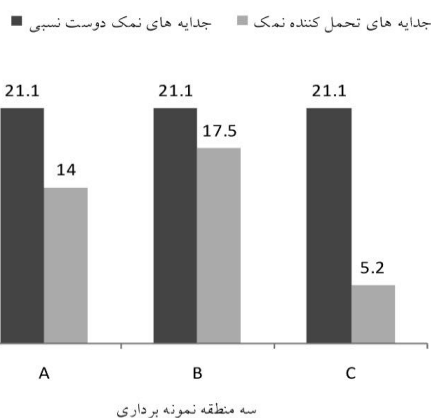
جدول ۳- ویژگی‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بررسی شده در سویه‌های منتخب

سویه	شکل سلول	رنگ کلونی	رنگ آمیزی گرم	KOH	حرکت	اکسیداز	کاتالاز	اسپور	
								موقعیت اسپور	شکل اسپور
GAA _x 1	باسیل	کرم	-	+	+	+	-	-	-
GAA _x 7	باسیل کوتاه	کرم روشن	-	+	-	+	+	-	-
GAA _x 6	ویبریو فرم	قرمز	-	+	+	-	+	-	-
GAA _x 9	باسیل ریز	کرم-قهوه‌ای	-	+	+	+	+	-	-
GAA _y 3	کوکسی	نارنجی	+	-	-	-	+	-	-
GAA _y 5	خمیده	بی‌رنگ	-	+	+	+	+	-	-
GAA _y 6	باسیل	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GAS _x 6	باسیل	سفید	+	-	-	-	+	انتهای	متورم
GAS _x 9	باسیل	صورتی-قهوه‌ای	v	+	-	+	+	-	-
GAS _x 17	باسیل ریز	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GAS _x 19	خمیده	زرد	-	+	+	+	+	-	-
GAS _x 20	خمیده	بی‌رنگ	-	+	+	+	+	-	-
GAS _x 25	باسیل	کرم	+	-	+	-	+	-	-
GAS _x 41	باسیل	صورتی کم‌رنگ	-	+	-	+	-	-	-
GAS _y 1	باسیل	کرم	+	-	-	-	+	-	-
GAS _y 9	باسیل	کرم	+	-	+	-	+	نیمه انتهای	متورم
GAW _x 1	باسیل ریز	نارنجی	-	+	-	+	-	-	-
GAW _x 3	باسیل ریز	زرد	-	+	+	+	+	-	-
GAW _y 5	باسیل	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GAW _y 6	باسیل	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GBF _x 3	باسیل	صورتی-قهوه‌ای	v	+	-	+	+	-	-
GBF _y 1	باسیل	کرم	+	-	+	-	+	انتهای	متورم
GBP _x 2	باسیل	صورتی کم‌رنگ	-	+	-	+	-	-	-
GBP _x 3	ویبریو فرم	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GBP _x 9	باسیل	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GBP _y 5	باسیل	بی‌رنگ	-	+	+	+	+	-	-
GBP _y 7	خمیده	بی‌رنگ	-	+	+	+	+	-	-
GBP _y 11	باسیل	زرد تیره	+	-	-	-	+	-	-
GBP _y 13	کوکسی	نارنجی	+	-	+	-	+	-	-
GBP _y 15	باسیل	زرد	+	-	+	+	+	-	-
GBP _y 16	باسیل	کرم	+	-	-	-	+	نیمه انتهای	متورم
GBS _x 1	باسیل ریز	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GBS _x 2	باسیل	کرم	-	+	-	+	+	-	-
GBS _x 4	باسیل	کرم	-	+	-	+	+	-	-
GBS _y 1	خمیده	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GBW _x 7	باسیل	کرم	v	-	+	+	+	-	-
GBW _x 8	باسیل	کرم	-	+	+	-	+	-	-
GBW _x 15	باسیل	کرم تیره	+	-	-	-	+	مرکزی	متورم
GBW _x 29	باسیل	کرم	-	+	-	+	+	-	-
GBW _y 1	باسیل	کرم	+	-	+	-	+	-	-
GBW _y 4	خمیده	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GBW _y 6	خمیده	کرم تیره	-	+	+	+	+	-	-

سویه	شکل سلول	رنگ کلونی	رنگ آمیزی گرم	KOH	حرکت	اکسیداز	کاتالاز	اسپور	
								موقعیت اسپور	شکل اسپور
GCF _x 1	خمیده	کرم	-	+	-	+	+	-	-
GCF _x 3	باسیل ریز	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GCF _x 8	باسیل کوتاه	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GCF _x 14	باسیل	کرم	+	-	-	+	+	مرکزی	بیضی
GCF _x 16	باسیل کوتاه	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GCF _x 20	باسیل	کرم	-	+	-	+	+	-	-
GCF _y 1	باسیل	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GCF _y 5	خمیده	کرم	-	+	+	+	+	-	-
GCS _x 7	باسیل	کرم	+	-	+	+	+	مرکزی	بیضی
GCS _x 17	باسیل کوتاه	کرم-زرد	+	-	-	+	-	-	-
GCS _x 21	باسیل کوتاه	زرد	+	-	-	+	-	-	-
GCS _x 25	باسیل ریز	قرمز	-	+	-	+	+	-	-
GCS _y 1	باسیل	کرم	+	-	+	+	-	-	-
GCW _x 8	باسیل	کرم-نارنجی	-	+	+	+	-	-	-
GCW _y 1	خمیده	کرم	-	+	+	+	+	-	-



شکل ۴- فراوانی سویه‌ها بر اساس پاسخ به غلظت نمک و اسیدیته متفاوت



شکل ۳- درصد سویه‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک در هر منطقه

تحمل‌کننده قلیا (۳۸ درصد) و کمترین فراوانی در تحمل‌کننده‌های نمک‌قلیادوست (۱۶ درصد) مشاهده شد. میزان فراوانی نمک‌دوست‌های آلکالوفیل و تحمل‌کننده‌های نمک آلکالوتولورنت، یکسان برآورد شد. **محدوده دمای رشد سویه‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک:** اغلب سویه‌ها نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک محدوده دمای رشدی ۰-۴۰ درجه سانتیگراد را نشان دادند. در برخی سویه‌ها رشد در دماهای

محدوده اسیدیته رشد سویه‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک: بیشتر سویه‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک رشد بهینه خود را در اسیدیته ۵/۸-۹ نشان دادند. ۶۱ درصد سویه‌های بررسی شده تحمل‌کننده قلیا بودند و در ۳۹ درصد جدایه‌ها رفتار قلیادوستی مشاهده شد. فراوانی جدایه‌ها در هر منطقه با توجه به پاسخ آنها به غلظت‌های مختلف نمک و اسیدیته متفاوت در شکل ۴ آورده شده است. بیشترین فراوانی در نمک‌دوست‌های

Caenispirillum, *Stappia*, *Talassospira*, *Marteella*, *Altererythrobacter*, *Erythrobacter* و *Nesiotobacter* به دست آمد و از رده *Gammaproteobacteria* جنس‌های *Pseudomonas*, *Marinabacter*, *Jdiomarina*, *Halomonas*, *Vibrio* و *Saccharospirillum* جدا شد. از رده *Betaproteobacteria* تنها جنسی که به دست آمد *Achromobacter* بود. سه جنس *Bacillus*, *Halobacillus* و *Paenibacillus* شامل باسیل‌های گرم‌مثبت و کوکوس‌های گرم‌مثبت جنس *Planococcus* در شاخه *Firmicutes* قرار گرفت. دو جدایه با اعضای جنس‌های *Aeromicrobium* و *Jonesia* در شاخه *Actinobacteria* قرابت داشت. تنها یک جنس *Cyclobacterium* از شاخه *Bacteroidetes* به دست آمد که شامل دو سویه باسیل گرم‌منفی بود.

همان‌طور که جدول ۴ نشان می‌دهد، میزان شباهت ترادف 16S rRNA در دو سویه GCFx20 و GBWx7 به گونه‌های ثبت شده نزدیک، ۱۰۰ درصد بود. این میزان شباهت برای ۱۵ سویه بین ۹۷-۹۸/۹ درصد بود که با انجام هیبریداسیون DNA-DNA با گونه‌های نزدیک و بررسی صفات فنوتیپی ممکن است در گونه جدیدی قرار گیرند. برای ۸ سویه، درصد شباهت کمتر از ۹۷ درصد نشان داده شده که بیانگر تفاوت قابل ملاحظه در سطح گونه و یا حتی جنس بین این سویه‌ها و گونه‌های ثبت شده بوده، این سویه‌ها می‌توانند بدون انجام هیبریداسیون DNA-DNA با گونه‌های نزدیک در گونه‌های جدید قرار گیرند (Stackebrandt and Woese, 1984). سویه GCWyl با ۹۱ درصد شباهت با گونه‌های ثبت شده در رده *Gammaproteobacteria* نامزد معرفی یک جنس جدید است.

بالتر یعنی ۴۵ درجه سانتیگراد هم مشاهده شد.

فعالیت آنزیم‌های هیدرولازی در سویه‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک: فعالیت هیدرولازی در میان سویه‌های منتخب انجام گرفت. از ۵۷ جدایه بررسی شده تنها در ۷ سویه از باکتری‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک فعالیت پروتئاز خارج سلولی دیده شد. فعالیت لیلازی در بیش از نیمی از جدایه‌ها نمایان شد و بیشترین فعالیت در بین آنزیم‌های بررسی شده را به خود اختصاص داد. ۱۵ سویه واجد فعالیت آمیلازی بودند و کمترین فعالیت در آنزیم‌های هیدرولازی بررسی شده مربوط به آنزیم داکسی‌ریبونوکلئاز بود که تنها در سه سویه مثبت گزارش شد.

شناسایی مولکولی سویه‌های منتخب: با مقایسه توالی ژن 16S rRNA به دست آمده از سویه‌های منتخب با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی Eztaxon، نزدیک‌ترین میکروارگانیزم شناخته شده به هر سویه مشخص گردید. از بین ۵۵ جدایه منتخب، ترادفیابی ژن 16S rRNA برای ۱۸ جدایه به صورت کامل و برای ۳۷ جدایه به صورت نسبی و با خواندن توالی در برای رفت انجام شد. بر اساس این نتایج، ۵۵ جدایه بررسی شده متعلق به چهار شاخه باکتریایی *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* و *Proteobacteria* بود. جدول ۴ میزان شباهت هر سویه با نزدیک‌ترین میکروارگانیزم شناخته شده را نشان می‌دهد. بیشتر سویه‌ها به شاخه *Proteobacteria* متعلق بودند به طوری که، سویه‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک، شامل باسیل‌های گرم‌منفی جدا شده در این شاخه در سه رده *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* و *Betaproteobacteria* قرار گرفتند.

در رده *Alphaproteobacteria* جنس‌های

جدول ۴- میزان شباهت سویه‌ها منتخب با نزدیک‌ترین گونه ثبت شده در پایگاه Eztaxon

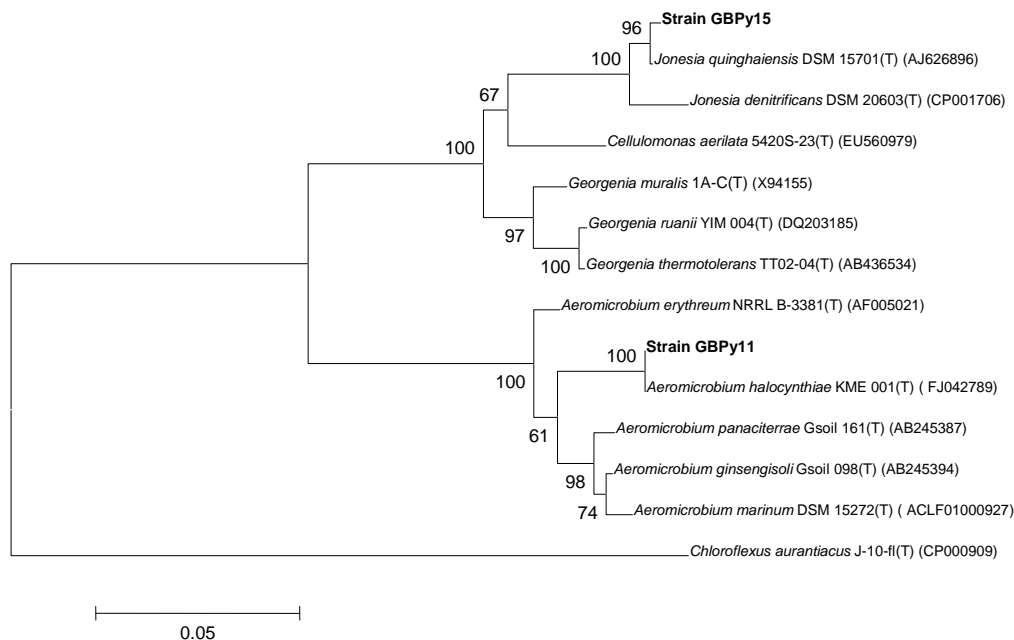
سویه	سویه‌های نزدیک	شماره دستیابی در بانک ژن	میزان شباهت (درصد)
GAA _x 1	<i>Pseudomonas pachastrellae</i> KMM 330(T)	AB125366	98.1
GAA _x 7	<i>Martellella mediterranea</i> MACL11(T)	-	97
GAA _x 6	<i>Vibrio ruber</i> VR1(T)	AF462458	99.5
GAA _x 9	<i>Rheinheimera aquimaris</i> SW-353(T)	EF076757	99.6
GAA _y 3	<i>Planococcus rifietoensis</i> M8(T)	AJ493659	99.6
GAA _y 5	<i>Saccharospirillum impatiens</i> EL-105(T)	-	95.7
GAA _y 6	<i>Halomonas boliviensis</i> LC1(T)	AY245449	99.2
GAS _x 6	<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4513(T)	AY724690	99.3
GAS _x 9	<i>Bacillus cohnii</i> DSM 6307(T)	-	97
GAS _x 17	<i>Idiomarina zobellii</i> KMM 231(T)	AF052741	99.7
GAS _x 19	<i>Idiomarina zobellii</i> KMM 231(T)	AF052741	99.8
GAS _x 20	<i>Marinobacter santoriniensis</i> NKSG1(T)	-	96.4
GAS _x 25	<i>Paenibacillus chungangensis</i> CAU 9038(T)	-	97.8
GAS _x 41	<i>Cyclobacterium lianum</i> HY9(T)	-	94.6
GAS _y 1	<i>Bacillus neizhouensis</i> JSM 071004(T)	-	97.2
GAS _y 9	<i>Bacillus cohnii</i> DSM 6307(T)	-	97
GAW _x 1	<i>Altererythrobacter ishigakiensis</i> JPCCMB0017(T)	-	98.1
GAW _x 3	<i>Idiomarina zobellii</i> KMM 231(T)	AF052741	99.8
GAW _y 5	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> MBIC1303(T)	AB019148	97.6
GAW _y 6	<i>Halomonas andesensis</i> LC6(T)	EF622233	99.5
GBF _x 3	<i>Stappia stellulata</i> IAM 12621(T)	D88525	99
GBF _y 1	<i>Bacillus cohnii</i> DSM 6307(T)	X76437	99.6
GBP _x 2	<i>Cyclobacterium lianum</i> HY9(T)	-	97
GBP _x 3	<i>Vibrio ordalii</i> ATCC 33509(T)	X74718	99.6
GBP _x 9	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803(T)	AF212204	97.7
GBP _y 5	<i>Pseudomonas sabulinigri</i> J64(T)	-	95.4
GBP _y 7	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23(T)	-	93.8
GBP _y 11	<i>Aeromicrobium halocynthiae</i> KME 001(T)	FJ042789	99.7
GBP _y 13	<i>Planococcus rifietoensis</i> M8(T)	AJ493659	99
GBP _y 15	<i>Jonesia quinghaiensis</i> DSM 15701(T)	AJ626896	99.6
GBP _y 16	<i>Bacillus horikoshii</i> DSM 8719(T)	X76443	99.3
GBS _x 1	<i>Idiomarina zobellii</i> KMM 231(T)	AF052741	99.6
GBS _x 2	<i>Marinobacter szutsaonensis</i> NTU-104(T)	EU164778	98.7
GBS _y 1	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23(T)	-	94.6
GBW _x 7	<i>Nesiotobacter exalbescens</i> LA33B(T)	AF513441	100
GBW _x 8	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> MBIC1303(T)	AB019148	99.9
GBW _x 15	<i>Bacillus hwajinpoensis</i> SW-72(T)	AF541966	99.4
GBW _x 29	<i>Achromobacter marplatensis</i> B2(T)	-	96.7
GBW _y 1	<i>Bacillus horikoshii</i> DSM 8719(T)	X76443	98.9
GBW _y 4	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> MBIC1303(T)	AB019148	98.4
GBW _y 6	<i>Halomonas andesensis</i> LC6(T)	EF622233	99.5
GCF _x 1	<i>Caenispirillum salinarum</i> AK4(T)	FN995238	99.4
GCF _x 3	<i>Idiomarina zobellii</i> KMM 231(T)	AF052741	99.6
GCF _x 8	<i>Thalassospira profundimaris</i> WP0211(T)	AY186195	99.4
GCF _x 14	<i>Halobacillus trueperi</i> DSM 10404(T)	AJ310149	99.7
GCF _x 16	<i>Idiomarina seosinensis</i> CL-SP19(T)	-	97.8
GCF _x 20	<i>Halomonas ventosae</i> A112(T)	AY268080	100
GCF _y 1	<i>Marinobacter lipolyticus</i> SM19(T)	AY147906	96.5
GCF _y 5	<i>Halomonas andesensis</i> LC6(T)	EF622233	99.3
GCS _x 7	<i>Bacillus vietnamensis</i> 15-1(T)	AB099708	97.8
GCS _x 17	<i>Halobacillus alkaliphilus</i> FP5(T)	AM295006	99.3

سویه	سویه‌های نزدیک	شماره دستیابی در بانک ژن	میزان شباهت (درصد)
GCS _x 21	<i>Halobacillus alkaliphilus</i> FP5(T)	AM295006	99.4
GCS _x 25	<i>Erythrobacter nanhaisediminis</i> T30(T)	FJ654473	99.6
GCS _y 1	<i>Bacillus neizhouensis</i> JSM 071004(T)	-	97
GCW _x 8	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> MBIC1303(T)	AB019148	99.9
GCW _y 1	<i>Saccharospirillum impatiens</i> EL-105(T)	-	91.1

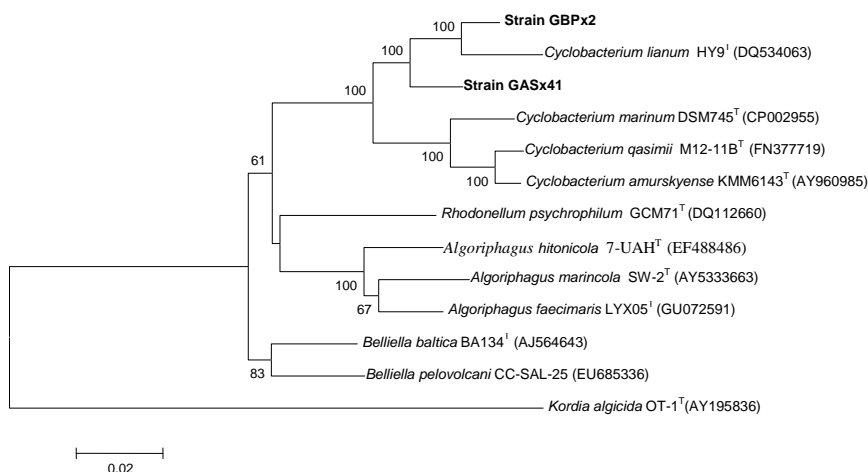
Bacteroidetes قرابت دارند نشان داده شده است. شکل ۷ درخت فیلوژنتیک باسیل‌های گرم‌مثبت و کوکوس‌های گرم‌مثبت ترادف‌یابی شده با سویه‌های ثبت شده نزدیک به آنها در رده *Firmicute* را نشان می‌دهد. در شکل ۸ درخت فیلوژنتیک سویه‌هایی که با گونه‌های متعلق به سه رده *α-Proteobacteria*، *β-Proteobacteria* و *γ-Proteobacteria* قرابت دارند نشان داده شده است. این سویه‌ها بیشترین فراوانی را در بین جدایه‌هایی که ترادف‌یابی برای آنها انجام شده است به خود اختصاص داده‌اند.

رسم درخت فیلوژنتیک سویه‌های

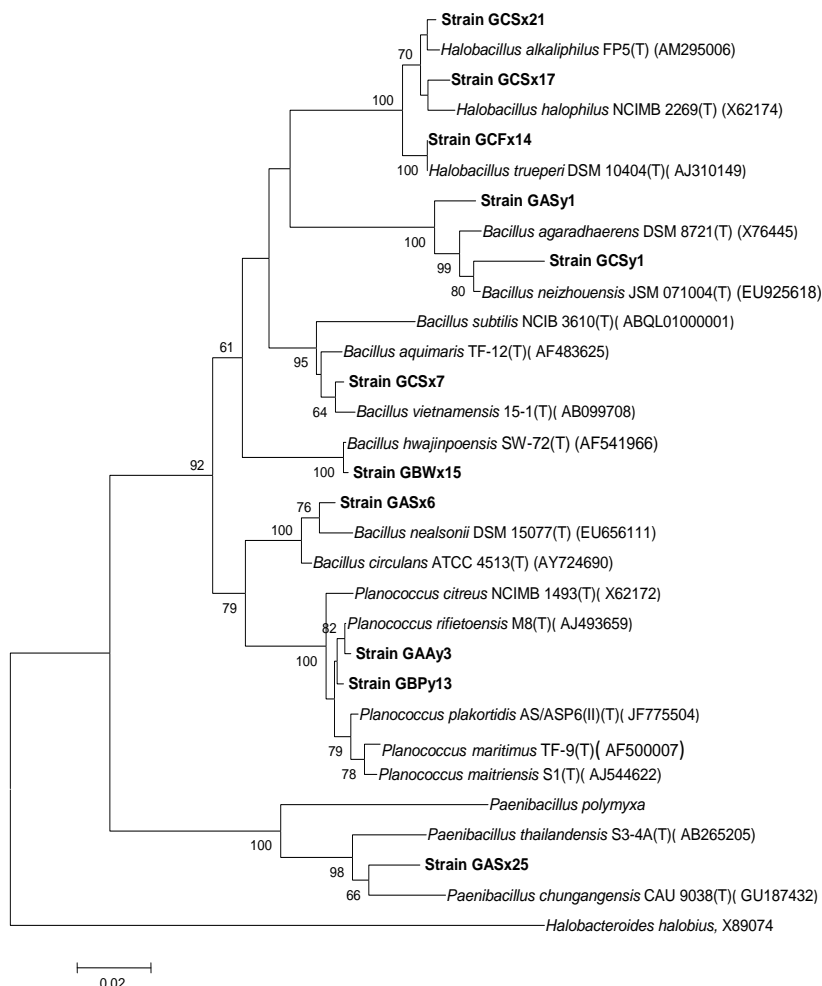
نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک: برای سویه‌های ترادف‌یابی شده پس از هم‌راستا کردن ترادف‌ها با ترادف گونه‌های نزدیک، درخت فیلوژنتیک با الگوریتم‌های Maximum Parsimony، Maximum likelihood و Neighbor-Joining رسم شد. در مقایسه درخت‌های رسم شده، محل قرارگیری زیرشاخه‌ها و شاخه‌ها در هر سه روش با یکدیگر هم‌خوانی داشت. درخت فیلوژنتیک سویه‌هایی که با گونه‌های متعلق به شاخه *Actinobacteria* قرابت دارند در شکل ۵ نشان داده شده است. در شکل ۶ درخت فیلوژنتیک سویه‌هایی که با گونه‌های متعلق به شاخه



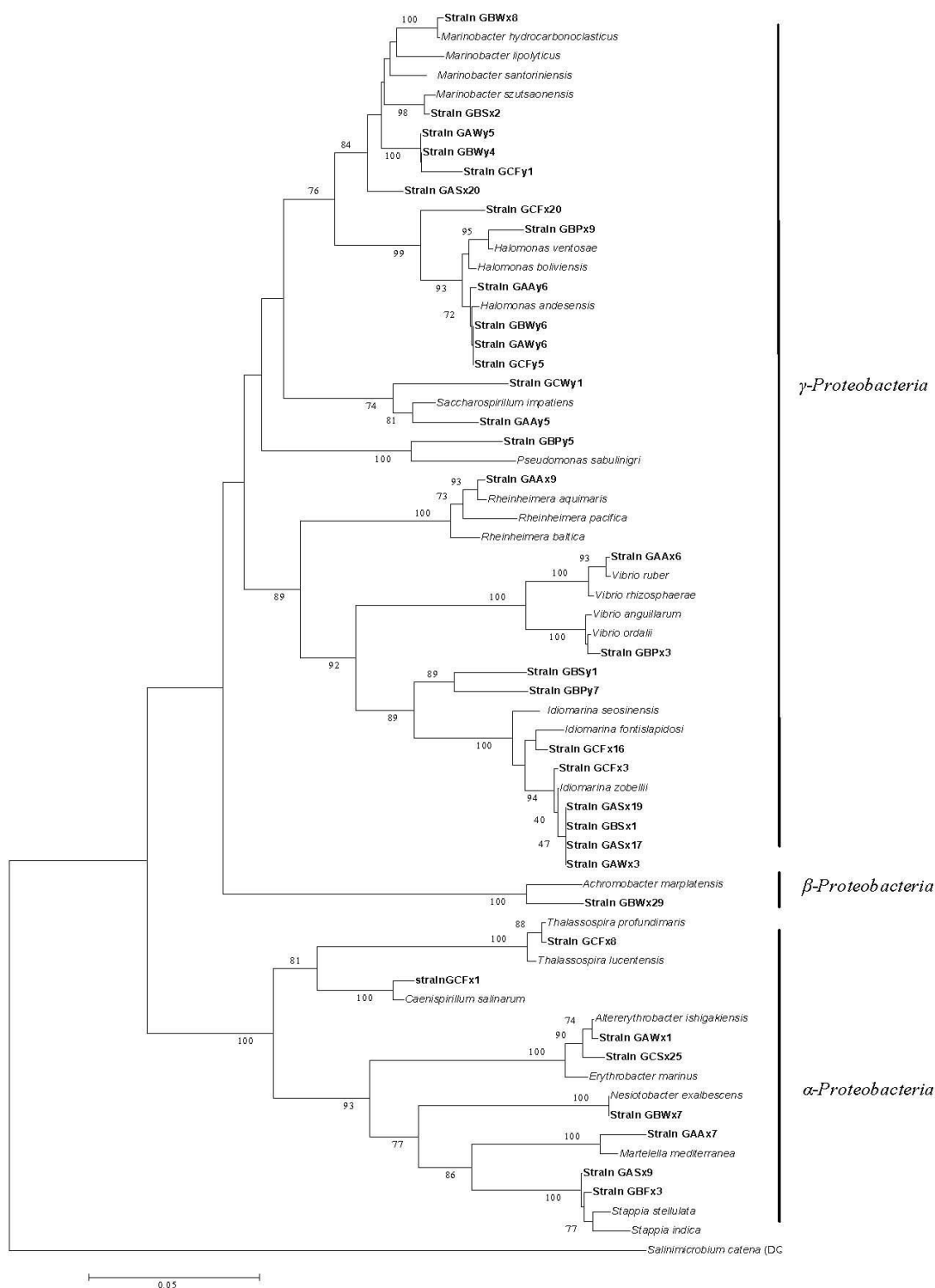
شکل ۵- دندروگرام 16S rRNA باکترهای ترادف‌یابی شده که به جنس‌های موجود در شاخه *Actinobacteria* قرابت نشان دادند. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری bootstrap از ۱۰۰ نمونه است. سویه *Chloroflexus aurantiacus* به عنوان outgroup قرار داده شد.



شکل ۶- دندروگرام 16S rRNA باکتری‌های مترادف‌یابی شده که به جنس‌های موجود در شاخه *Bacteroidetes* قرابت نشان دادند. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. سویه *Kordia algicida* OT-1^T به عنوان outgroup قرار داده شد.



شکل ۷- دندروگرام 16S rRNA باکتری‌های مترادف‌یابی شده که به جنس‌های باسیلوس و جنس‌های وابسته و کوکوس‌های گرم‌مثبت موجود در شاخه *Firmicute* قرابت نشان دادند. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. سویه *Halobacteroides halobius*, X89074 به عنوان outgroup قرار داده شد.



شکل ۸- دندروگرام 16S rRNA باکتری‌های ترادف‌یابی شده که به جنس‌های موجود در سه رده γ -Proteobacteria، β -Proteobacteria و α -Proteobacteria قرار داده شده است. سویه *Salinimicrobium catena* (DQ640642) به عنوان outgroup قرار داده شد. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه گیری bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است.

بحث

به منظور درک چگونگی عمل جامعه میکروبی و کل اکوسیستم، به طور محض شناسایی اجزای مختلف جامعه مقدماتی ترین مرحله است، که نیاز به داده‌هایی در مورد عملکرد آنها، میان کنش و دینامیک فضایی و زمانی و شاخص‌های محیطی برای تکمیل آن دارد. گسترش الگوهای اکوسیستم بر طبق همه این اطلاعات ضروری است، اما نظر به اینکه داده‌های اولیه ارتباط‌دهنده اکثر میکروب‌ها به عملکردشان هنوز ناشناخته است، این یک هدف دراز مدت است (López-García and Moreira, 2008). شوری پایین تالاب گمیشان همچنین اسیدیته قلیایی آن، این محیط را از دیگر اکوسیستم‌های شور بررسی شده در ایران نظیر دریاچه ارومیه، دریاچه آران و بیدگل با شوری بالا و اسیدیته خنثی و دریاچه پرشور حوض سلطان متمایز می‌کند. بنابراین، امکان دستیابی به جمعیت‌های میکروبی متفاوت از سایر اکوسیستم‌های بررسی شده وجود دارد. در این پژوهش، جداسازی و شناسایی سویه‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک قابل کشت تالاب قلیایی شور-دریایی گمیشان واقع در شمال شرق ایران، سنجش شد. جدایه‌های حاصل از محیط MA نظیر GAA_x7 ، GAA_x9 ، GAA_x6 ، GAW_x3 ، GAS_x19 ، GAS_x9 ، GAS_x41 ، GBF_x3 ، GBP_x2 ، GBP_x9 ، GBS_x1 و GCS_x25 قرابت زیادی با گونه‌های *Aeromicrobium*، *Altererythro bacter ishigakiensis*، *halocynthiae*، *Cyclobacterium lianum*، *Bacillus neizhouensis*، *Halomonas*، *Erythro bacter nanhaisediminis*، *Martellella*، *Idiomarina zobellii*، *sulfidaeris*، *Rheinheimera*، *aquimaris*، *mediterranea*

Vibrio ruber و *Stappia stellulata* که منشأ دریایی دارند، نشان دادند. به دلیل اینکه این تالاب منشأ دریایی دارد و یک تالاب دریایی-ساحلی است چنین نتیجه‌ای قابل پیش‌بینی بود. قابل توجه است که بیشترین جدایه‌های منسوب به گونه‌های دریایی از نقطه A جداسازی شد و این منطقه در واقع نزدیک‌ترین فاصله را از نظر موقعیت جغرافیایی با دریای خزر نسبت به دو منطقه دیگر نمونه گیری دارد. از این رو، فراوانی بیشتر این نوع جدایه‌ها از این مکان دور از انتظار نیست.

با توجه به اسیدیته قلیایی تالاب گمیشان، استفاده از محیط‌های کشت با اسیدیته قلیایی ضروری به نظر می‌رسید و منجر به جداسازی سویه‌هایی گردید که قرابت زیادی به گونه‌های قلیادوست از قبیل *Bacillus* و *Halobacillus alkaliphilus* FP5(T) *horikoshii* DSM 8719(T) نشان دادند. از آنجا که گونه‌های جنس *Bacillus* توانایی گسترده‌ای در تولید آنزیم‌های هیدرولازی دارند، ارزیابی این سویه‌ها از نظر تولید آنزیم‌های قلیایی می‌تواند در زیست فناوری حایز اهمیت باشد.

مطالعات نشان داد که بیشترین جدایه‌ها حاصل از کشت، متعلق به باسیل‌های گرم مثبت (۵۹ درصد) به ویژه باسیل‌های گرم مثبت اسپوردار است که چنین یافته‌ای، تأییدی بر شرایط سخت این مکان اکولوژیک متغیر و پویاست. اسپور این باکتری‌ها قابلیت مقاومت نسبت به شرایط سخت و حالت خفتگی را دارا بوده، می‌تواند شرایط سخت و نامطلوب را تحمل نماید. دلیل دیگر آن می‌تواند استفاده از محیط‌های کشت انتخابی و شرایط آزمایش باشد که منجر به جداسازی بیشتر باسیل‌های گرم مثبت شده است. در مطالعه باباویان (۱۳۸۶)، جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک‌دوست

تالاب گمیشان بر خلاف دریاچه نمکی آران و بیدگل که یک دریاچه اتالازوهالین است، یک تالاب دریایی-ساحلی است و وجود جدایه‌های گرم منفی و بی‌ریوفرم و ماریپیچی قابل انتظار است. بنابراین، تفاوت‌های مشاهده شده را می‌توان به ویژگی‌های متفاوت زیستگاه‌های مختلف نسبت داد و صحت این موضوع که تنوع زیستی هر زیستگاه از ویژگی‌های منحصر به فرد آن محسوب می‌شود و پژوهش روی هر محیط جدید اهمیت خاص خود را دارد، تأیید کرد. کوکوس‌های گرم مثبت تنها ۷ درصد سویه‌ها را تشکیل دادند.

در هر سه منطقه نمونه‌برداری در تالاب گمیشان میزان جدایه‌های نمک‌دوست نسبی بیشتر بود. این حالت در منطقه C با توجه به میزان شوری سنجش شده بالاتر نسبت به دو مکان دیگر نمونه‌گیری (A و B) برجسته‌تر بود. از سوی دیگر، استفاده از محیط‌های انتخابی احتمالاً تمایل را به سمت فراوانی بیشتر باکتری‌های نمک‌دوست سوق داده است.

با توجه به اسیدیته قلیایی این اکوسیستم، جداسازی سویه‌های قلیادوست و تحمل‌کننده قلیا قابل انتظار بود. ۳۹ درصد سویه‌های بررسی شده قلیادوست بودند، به طوری که بهینه رشد خود را در اسیدیته ۹ نشان دادند و توانایی رشد در اسیدیته ۱۰ را داشتند. ۲۳ درصد این سویه‌ها را جدایه‌های نمک‌دوست قلیادوست تشکیل دادند. یعنی این سویه‌ها رشد بهینه خود را در دو نوع شرایط تنشی فیزیکیوشیمیایی نشان دادند و می‌توان آنها را جزو باکتری‌های پلی‌اکستریموفیل در نظر گرفت. از طرف دیگر، بیشترین فراوانی مربوط به سویه‌های تحمل‌کننده قلیا بود که ۳۸ درصد آنها هالوآلکالوتلورنت بودند و ۲۳ درصد باقی مانده تحمل‌کننده نمک آلکالوتلورنت بودند. در بررسی تنوع

نسبی بومی دریاچه نمک آران و بیدگل انجام شد و بر اساس شباهت‌های فنوتیپی در میان جدایه‌های جداسازی شده، در نهایت، ۸۳ سویه نمک‌دوست نسبی جدا شد که ۴۴ سویه آنها باسیل گرم مثبت بودند (بابولیان، ۱۳۸۶). همین نتیجه در بررسی‌های بعدی بر روی دریاچه آران و بیدگل با فراوانی بیشتری از باسیل‌های گرم مثبت به دست آمده است (دیدری خمسه مطلق، ۱۳۸۸؛ باقری، ۱۳۸۸). در مطالعه مشابهی بر روی دریاچه پرشور ارومیه نیز باسیل‌های گرم مثبت دارای بیشترین فراوانی بودند و ۵۹/۹ درصد جدایه‌ها را به خود اختصاص دادند (مهرشاد، ۱۳۹۰)، که این فراوانی به نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نزدیک‌تر است. در بررسی تنوع زیستی دریاچه‌های شور در مغولستان داخلی توسط *Ventosa* و همکاران (۲۰۰۶) ۱۶۳ باکتری نمک‌دوست نسبی جدا شد که ۱۰۲ سویه آن به جنس‌های *Bacillus*، *Halobacillus*، *Virgibacillus*، *Gracilibacillus*، *Oceanobacillus* و *Filobacillus* تعلق داشتند. اما در مطالعات مشابه توسط Ghozlan و همکاران (۲۰۰۶) در محیط‌های شور مصر به جداسازی ۷۶ باکتری نمک‌دوست نسبی گرم منفی و ۱۴ باکتری نمک‌دوست نسبی گرم مثبت منجر شد (Ghozlan et al., 2006).

در مرحله بعد باسیل‌های گرم منفی با ۲۴ درصد فراوانی و اشکال خمیده که شامل سلول‌های و بی‌ریوفرم و ماریپیچی بود، ۱۴ درصد جدایه‌ها را به خود اختصاص دادند. در بررسی مشابه دیگر توسط دیدری خمسه مطلق (۱۳۸۸) و باقری (۱۳۸۸) به ترتیب بر روی جدایه‌های تحمل‌کننده نمک و نمک‌دوست نسبی دریاچه شور آران و بیدگل، اشکال و بی‌ریوفرم و ماریپیچی گزارش نشده است. با توجه به این مطلب که

زیستی باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک دریاچه ارومیه، دو سویه نمک دوست قلیادوست که به گونه قلیادوست *Alkalibacterium putridalgicola* قرابت داشتند، به دست آمد (مهرشاد، ۱۳۹۰). به طور کلی، ۹۵ باکتری نمک دوست قلیادوست از زیستگاه‌های نمکی مختلف جدا شده است. بیشتر این سویه‌ها می‌توانند در دامنه ۵-۲۵ درصد کلرید سدیم و اسیدیته ۸-۱۰ رشد کنند. در تحقیقی Dodia و همکاران (۲۰۰۶) بر اساس همسانی ژن 16S rRNA، ۵ سویه از ۱۳ جدایه جدید بود در حالی که ۸ سویه دیگر با بیش از ۹۰ درصد همسانی توالی با نمک دوست‌ها و قلیادوست‌های متفاوت جداسازی شده از دریاچه‌های قلیایی و سایر زیستگاه‌های پرشور مختلف در سراسر کره خاکی ظاهر شدند (Dodia et al., 2006). در بررسی دیگر توسط Foti و همکاران (۲۰۰۸) بر روی دریاچه‌های قلیایی روسیه، هیچ یک از گونه‌های توصیف شده به واقع به عنوان نمک دوست قلیادوست و نمک دوست تحمل کننده قلیا تعریف نشد. سایر مطالعات بر روی دریاچه‌های قلیایی کنیا و مصر بر اساس تکنیک مستقل از کشت کلون انجام شد، سویه‌های به دست آمده به نمک دوست‌های قلیادوست توصیف شده وابسته بودند (Foti et al., 2008).

باکتری‌های نمک دوست قلیادوست در طی دهه گذشته مورد توجه شایانی بوده و هستند و به طور وسیعی تنوع فیلوژنتیک آنها بررسی شده است. اطلاعات محدودی روی پتانسیل آنزیمی و خصوصیات آنزیمی این ارگانسیم‌ها در دسترس است (Singh et al., 2006). از ۵۷ سویه مطالعه شده از نظر وجود آنزیم‌های هیدرولیتیک ۳۲ جدایه لیپاز، ۱۵ جدایه آمیلاز، ۷ جدایه پروتئاز و ۳ جدایه DNase تولید

می‌کنند. ۱۵ سویه از نظر تولید آنزیم هیدرولازی بررسی شده فاقد فعالیت هستند. تمام سویه‌های پروتئاز مثبت (تولید کننده پروتئاز) از باکتری‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک تحمل کننده قلیا هستند. فعالیت لیپازی در بیش از نیمی از جدایه‌ها مثبت بود. جالب توجه است که ۷ سویه از جدایه‌های نمک دوست قلیادوست به دست آمده مولد آنزیم لیپاز خارج سلولی هستند، این آنزیم‌ها می‌توانند در زیست فناوری حایز اهمیت باشند. فعالیت آنزیم آمیلاز نیز در چهار سویه نمک دوست قلیادوست مشاهده شد. علاوه بر آن در سویه‌های تحمل کننده نمک قلیادوست و تحمل کننده قلیا نیز این آنزیم شناسایی شد. تنها در یک سویه از جدایه‌ها نمک دوست قلیادوست فعالیت آنزیم داکسی ریبونوکلاز مشاهده شد. پژوهش انجام شده بر روی دریاچه حوض سلطان منجر به جداسازی ۲۳۱ جدایه نمک دوست شد که طیف وسیعی از آنزیم‌های هیدرولازی را تولید می‌کردند و میکروارگانسیم نمک دوست فاقد فعالیت هیدرولیتیک مشاهده نشد. از بین آنزیم‌های مطالعه شده، ۱۹۵ سویه تولید آمیلاز، ۱۷۷ سویه پروتئاز، ۶۵ سویه DNase و ۲۸ سویه مولد لیپاز بودند. در مقایسه با نتایج حاصل از پژوهش حاضر که سویه‌های مولد آنزیم لیپاز بیشترین فراوانی را در جدایه‌های مورد بررسی دارند، باکتری‌های نمک دوست جدا شده مولد لیپاز از دریاچه حوض سلطان کمترین فراوانی را به خود اختصاص دادند (Rohban et al., 2009). در بررسی تنوع زیستی میکروارگانسیم‌های نمک دوست تولید کننده آنزیم‌های هیدرولیتیک خارج سلولی در دریاچه ارومیه توسط آموزگار و همکاران (۱۳۸۶)، ۱۸۸ جدایه نمک دوست جداسازی شد که از نظر تولید آنزیم‌های هیدرولازی

ارزیابی شدند. ۱۰۶ جدایه قادر به تولید آنزیم داکسی ریبونوکلاز، ۶۳ جدایه لیاز و ۵۷ جدایه آمیلاز و ۴۹ جدایه پروتاز مثبت بودند. برخلاف پژوهش حاضر که کمترین فراوانی مربوط به سویه‌های مولد داکسی ریبونوکلاز است، در بررسی انجام شده روی جدایه‌های نمک‌دوست دریاچه ارومیه سویه‌های مولد این آنزیم بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند (زهراپی، ۱۳۸۶).

۵۵ سویه منتخب با توالی‌یابی 16S rRNA در ۲۲ جنس مختلف قرار گرفتند، که به شش رده باکتریایی *Firmicutes*، *Bacteroidetes*، *Actinoacteria*، *α-Proteobacteria* و *γ-Proteobacteria* و *β-Proteobacteria* تعلق داشتند و اغلب سویه‌ها به رده *Gammaproteobacteria* متعلق بودند و در مجموع، ۲۳ سویه نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک در این رده قرار گرفت که شامل ۱۱ باسیل گرم‌منفی و مابقی اشکال خمیده گرم‌منفی شامل ویبریوفرم و مارپیچی بود. باسیل‌های گرم‌منفی در جنس‌های *Halomonas*، *Idiomarina*، *Marinobacter*، *Pseudomonas* و *Rheinheimera* قرار گرفتند و سلول‌های مارپیچی و ویبریوفرم به چهار جنس *Idiomarina*، *Marinobacter*، *Saccharospirillum* و *Vibrio* تعلق داشتند. ۱۵ سویه به رده *Firmicutes* متعلق بود که شامل ۱۳ باسیل گرم‌مثبت و ۲ کوکوس گرم‌مثبت بود. باسیل‌های گرم‌مثبت در جنس‌های *Bacillus*، *Halobacillus* و *Paenibacillus* قرار گرفتند و کوکوس‌های گرم‌مثبت به جنس *Planococcus* قرابت نشان دادند. در رده *Alphaproteobacteria* ۸ باسیل گرم‌منفی متعلق به جنس‌های *Altererythrobacter*، *Martellella*، *Erythrobacter*، *Caenispirillum*

Thalassospira و *Stappia*، *Nesiotobacter* مشاهده شد. تنها جنسی که به رده *Betaproteobacteria* تعلق داشت جنس *Achromobacter* بود. از شاخه *Actinobacteria* دو باسیل گرم‌مثبت متعلق به جنس‌های *Aeromicrobium* و *Jonesia* جداسازی شد. تنها جنس جدا شده از شاخه *Bacteroidetes*، جنس *Cyclobacterium* بود که دو باسیل خمیده گرم‌منفی را به خود اختصاص داد. در مطالعه باباولیان (۱۳۸۶)، جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی بومی دریاچه نمک آران و بیدگل و توانایی این میکروارگانیسم‌ها در تولید آنزیم‌های هیدرولازی خارج سلولی بررسی شده است. بر اساس شباهت‌های فتوتیپی در میان جدایه‌های جداسازی شده، در نهایت، ۸۳ سویه نمک‌دوست نسبی جدا شد که به جنس‌های نمک‌دوست نسبی *Bacillus*، *Thalassobacillus*، *Halomonas*، *Halobacillus*، *Salinicoccus*، *Idiomarina*، *Marinococcus*، *Staphylococcus* و *Salicola* قرابت داشته، بیشترین فراوانی مربوط به جنس‌های *Salicola* و *Halobacillus* گزارش گردید (باباولیان، ۱۳۸۶). مطالعات مشابه توسط آموزگار و همکاران (۱۳۸۸) بر روی دریاچه نمک آران و بیدگل انجام شد و به طور مجزا تنوع زیستی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک بررسی شده است. در بررسی که روی باکتری‌های تحمل‌کننده نمک دریاچه صورت گرفت، اغلب سویه‌ها به رده *Firmicutes* متعلق بود و در مجموع، ۴۱ سویه تحمل‌کننده نمک در این رده قرار گرفت که شامل ۳۵ باسیل گرم‌مثبت و ۶ کوکوس گرم‌مثبت بود. باسیل‌های گرم‌مثبت شامل جنس‌های *Aneurinibacillus*، *Bacillus*، *Brevibacillus*، *Marinilactibacillus*

۲۲ سویه منتخب با توالی‌یابی 16S rRNA در ۲۲ جنس مختلف قرار گرفتند، که به شش رده باکتریایی *Firmicutes*، *Bacteroidetes*، *Actinoacteria*، *α-Proteobacteria* و *γ-Proteobacteria* و *β-Proteobacteria* تعلق داشتند و اغلب سویه‌ها به رده *Gammaproteobacteria* متعلق بودند و در مجموع، ۲۳ سویه نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک در این رده قرار گرفت که شامل ۱۱ باسیل گرم‌منفی و مابقی اشکال خمیده گرم‌منفی شامل ویبریوفرم و مارپیچی بود. باسیل‌های گرم‌منفی در جنس‌های *Halomonas*، *Idiomarina*، *Marinobacter*، *Pseudomonas* و *Rheinheimera* قرار گرفتند و سلول‌های مارپیچی و ویبریوفرم به چهار جنس *Idiomarina*، *Marinobacter*، *Saccharospirillum* و *Vibrio* تعلق داشتند. ۱۵ سویه به رده *Firmicutes* متعلق بود که شامل ۱۳ باسیل گرم‌مثبت و ۲ کوکوس گرم‌مثبت بود. باسیل‌های گرم‌مثبت در جنس‌های *Bacillus*، *Halobacillus* و *Paenibacillus* قرار گرفتند و کوکوس‌های گرم‌مثبت به جنس *Planococcus* قرابت نشان دادند. در رده *Alphaproteobacteria* ۸ باسیل گرم‌منفی متعلق به جنس‌های *Altererythrobacter*، *Martellella*، *Erythrobacter*، *Caenispirillum*

Pontibacter, *Kocuria*, *Alkalibacterium*,
Oceanobacillus, *Micrococcus*, *Sanguibacter*
 و *Thalassobacillus*, *Microbacterium*
Piscibacillus و جدایه‌های گرم منفی در جنس‌های
Marinobacter, *Paracoccus*, *Halomonas*
Salicola, *Pontibacter*, *Lysobacter*, *Providencia*
 و *Brevundimonas* منجر شد (مهرشاد، ۱۳۹۰).

برخلاف پژوهش حاضر، در هر چهار پژوهش تفسیر شده، باسیل‌های گرم مثبت بیشترین میزان فراوانی را به خود اختصاص دادند. سویه‌های جداسازی شده در این بررسی تنوع فیلوژنتیک بالاتری نسبت به مطالعات گذشته دارد و این تنوع در شش رده باکتریایی پراکنده شده است.

در هیچ یک از این پژوهش‌ها جنس‌های
Aeromicrobium, *Achromobacter*,
Caenispirillum, *Altererythrobacter*,
Jonesia, *Erythrobacter*, *Cyclobacterium*,
Planococcus, *Nesiotobacte*, *Marteleva*
Stappia, *Saccharospirillum*, *Rheinheimera*

و *Thalassospira* و *Vibrio* مشاهده نشد. تعداد و تنوع نمونه‌ها، فصل‌های مختلف نمونه‌برداری، تعداد و تنوع نمونه‌های به کار گرفته شده، توزیع طبیعی میکروارگانیسم‌ها در محیط‌زیست و مشخصات اکولوژی هر منطقه همگی از جمله مواردی هستند که در نوع باکتری‌های جداسازی شده اثر خواهند داشت (Alain and Querellou, 2009). احتمال افزایش تنوع موجود با افزایش هر بار نمونه‌برداری، بدون رسیدن به آستانه شناخت تنوع کامل در تعداد نمونه‌برداری امکان‌پذیر نیز در تفاوت نوع و تعداد میکروارگانیسم‌های جدا شده در هر پژوهش تأثیرگذار خواهد بود (Hughes et al., 2001).

Ornithinibacillus, *Oceanobacillus*
Virgibacillus و *Paenibacillus* بود. کوکوس‌های گرم مثبت رده *Firmicutes* در چهار جنس *Jeotgalicoccus*, *Aerococcus*, *Staphylococcus* و *Salinicoccus* قرار گرفت. چهار جدایه با اعضای رده *Actinobacteria* قرابت داشت که دو جدایه متعلق به جنس *Arthrobacter* و دو جدایه در جنس‌های *Kocuria* و *Microbacterium* گزارش شدند. در رده *γ-Proteobacteria* سه باسیل گرم منفی گزارش شد که با اعضای جنس‌های *Pseudomonas*, *Halomonas* و *Acinetobacter* قرابت نشان دادند. یک کوکوس گرم منفی متعلق به جنس *Paracoccus* و یک باسیل گرم منفی متعلق به جنس *Brevundimonas* در رده *α-Proteobacteria* نیز گزارش شدند (دیدری خمسه مطلق، ۱۳۸۸). همچنین، مطالعه‌ای بر روی باکتری‌های نمک دوست نسبی دریاچه آران و بیدگل به جداسازی سویه‌های گرم مثبت که از نظر فیلوژنتیک در جنس‌های *Gracilibacillus*, *Bacillus*, *Aquisalibacillus*, *Oceanobacillus*, *Halobacillus*, *Paraliobacillus*, *Ornithinibacillus*, *Salirhabdus*, *Salinicoccus*, *Piscibacillus* و *Thalassobacillus* قرار می‌گرفتند، منجر شد. سویه‌های گرم منفی از جنس‌های *Salicola*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Marinobacter* و *Idiomarina* جداسازی و شناسایی شدند (باقری، ۱۳۸۸). بررسی تنوع زیستی باکتری‌های نمک دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک سواحل غربی دریاچه ارومیه به جداسازی جدایه‌های گرم مثبت در جنس‌های *Gracilibacillus*, *Planococcus*, *Halobacillus*, *Ornithinibacillus*, *Staphylococcus*, *Basillus*

منابع

- بابولیان، ح. (۱۳۸۶) تنوع زیستی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی تولیدکننده آنزیم‌های هیدرولیتیک دریاچه نمک آران و بیدگل. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.
- باقری، م. (۱۳۸۸) بررسی تنوع باکتری‌های نمک‌دوست نسبی هتروتروف هوازی و قابل کشت در دریاچه آران و بیدگل. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- دیدری خمسه مطلق، م. (۱۳۸۸) بررسی تنوع باکتری‌های تحمل‌کننده نمک هوازی هتروتروف قابل کشت در دریاچه آران و بیدگل. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- بهروزی‌راد، ب. (۱۳۸۶) تالاب‌های ایران. سازمان جغرافیایی نیروی‌های مسلح، تهران.
- زهرایی، ش. (۱۳۸۶) بررسی تنوع زیستی میکروارگانسیم‌های نمک‌دوست تولیدکننده آنزیم‌های هیدرولیتیک خارج سلولی در دریاچه ارومیه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- مهرشاد، م. (۱۳۹۰) بررسی تنوع زیستی باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک سواحل غربی دریاچه ارومیه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- Alain, K. and Querellou, J. (2009) Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles*. 4: 583-594.
- Amoozgar, M. A., Malekzadeh, F. and Malik, K. A. (2003) Production of amylase by newly isolated moderate halophile *Halobacillus* sp. Strain MA-2. *Microbiology Methods* 52: 353-359.
- Amoozgar, M. A., Schumann, P., Hajighasemi, M. and Fatemi, A. Z. (2008) *Salinivibrio proteolyticus* sp. nov. a moderately halophilic and proteolytic species from a hypersaline lake in Iran. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 58: 1159-1163.
- Atlas, R. M. and Bartha, R. (1998) *Microbial ecology: fundamentals and applications*. 4th edition. Addison-Wesley. California.
- Caton, T. (2004) Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Microbial Ecology* 4: 449-462.
- Dodia, M. S., Patel, R. K., Rupal, H., Joshi, R. H., Patel, B. K. C. and Singh, S. P. (2006) Diversity and molecular phylogeny of the haloalkaliphilic bacteria isolated from Western coast of India. The sixth International Congress on Extremophiles. Brest, France.
- Foti, M. J., Sorokin, D. Y., Zacharova, E. E., Pimenov, N. V., Kuenen, J. G. and Muyzer, G. (2008) Bacterial diversity and activity along a salinity gradient in soda lakes of the Kulunda Steppe (Altai, Russia). *Extremophiles* 12: 133-145.
- Gerhardt, P. and Murray, R. G. E. (1994) *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington.
- Ghozlan, H., Deif, H., Kandil, R. A. and Sabry S. (2006) Biodiversity of moderately halophilic bacteria in hypersaline habitats in Egypt. *The Journal of General and Applied Microbiology* 52: 63-72.
- Grant, W. D. (1992) *Hypersaline environments*. Proceedings of the Sixth International Symposium on Microbial Ecology. Barcelona, Spain.
- Hughes, J. Hellmann, J. Ricketts, T. H. and Bohannan B. J. M. (2001) Counting the uncountable:

- statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied Environmental Microbiology* 10: 4399-4406.
- Kamekura, M. (1998) Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles* 2: 289-295.
- Kushner, D. J. and Kamekura, M. (1988) *Physiology of halophilic eubacteria*. CRC Press, Boca Raton.
- López-García, P. and Moreira D. (2008) Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Research in Microbiology* 1: 67-73.
- Makhdoumi Kakhki, A., Amoozegar, M. A., Kazemi, B., Paši, L. and Ventosa, A. (2012) Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol salt lake, the largest hypersaline playa in Iran. *Microbes and Environments* 1: 87-93.
- Martin, S., Marquez, M., Sanchez-Porro, C., Mellado, E., Arahal, D. R. and Ventosa, A. (2003) *Marinobacter lipolytic* sp. nov. a novel moderate halophile with lipolytic activity. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 53: 1383-1387.
- Oren, A. (1994) The ecology of the halophilic archaea. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology* 13: 415-440.
- Oren, A. (2002a) *Halophilic microorganisms and their environments*. Kluwer Scientific Historical Survey, Dordrecht.
- Oren, A. (2002b) Molecular ecology of extremely halophilic archaea and bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology* 1: 1-7.
- Rodriguez-Valera, F. (1993) *Introduction to saline environments. The biology of halophilic bacteria*. CRC Press Incorporation. Boca Raton.
- Rohban, R., Amoozegar, M. A. and Ventosa, A. (2009) Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolases from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology Official Journal of the Society for Industrial Microbiology* 36: 333-340.
- Ronald, M. (2005) *Media for environmental microbiology*. 2nd edition, Taylor and Francis Group, Boca Raton.
- Simbert, R. M. and Krieg, N. R. (1994) Phenotypic characterization. In: *Methods for general and molecular bacteriology* (eds. Gerhard, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. and Krieg, N. R.) 607-655. American Society for Microbiology, Washington.
- Singh, S. P., Dodia, M. S. and Joshi, R. H. (2006) Diversity among haloalkaliphilic bacteria isolated from Western India with respect to the occurrence and properties of extracellular alkaline proteases. *The Sixth International Congress on Extremophiles*. Brest, France.
- Spencer, J. F. T. and Ragout de Spencer, A. L. (2004) *Environmental microbiology: methods and protocols*. Humana Press Incorporation, New Jersey.
- Stackebrandt, E. and Woese, C. R. (1984) The phylogeny of prokaryotes. *Microbiological sciences* 5: 117-122.
- Tamura, K. and Dudley, J. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 8: 1596-1599.
- Ulukanli, Z. (2002) Alkaliphilic micro-organisms and habitats. *Turkish Journal of Biology* 26: 181-191.

Isolation and identification of poly-extremophilic alkalophilic, halophilic and halotolerant bacteria from alkaline thalassohaline Gomishan wetland

Azadeh Shahinpei^{1,2}, Mohammad Ali Amoozegar^{2,3*} and Abbas Akhavan-Sepahi⁴

¹ Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Microbiology, Faculty of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Centre, Karaj, Iran

⁴ Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

Abstract

Gomishan wetland is a natural ecosystem located in 35 km north west of Gorgan, in the west vicinity of Khajeh Nafas city and Gomishan. Twice sampling from 3 different geographic positions in dry and rainy seasons, led to the isolation of 224 isolates. For 57 isolates, halophilic and halotolerant behaviors and also optimum and growth range in different pH and temperatures were determined. Most of the moderately halophilic and halotolerant strains were capable of growing optimally in media with pH 8.5-9 and optimum growth temperatures ranging from <4 to 40 °C. The isolates were examined for hydrolytic enzymes production. Most of the isolates showed lipase activities and a total of 15, 7 and 3 strains produced amylases, proteases and DNases, respectively. The enzymes could be useful in some industrial processes. 16S rDNA phylogenetic analysis were done for 55 strains. According to this analysis, strains were placed in 22 different genera: *Achromobacter*, *Aeromicrobium*, *Altererythrobacter*, *Bacillus*, *Caenispirillum*, *Cyclobacterium*, *Erythrobacter*, *Halobacillus*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Jonesia*, *Marinobacter*, *Martellella*, *Nesiotobacter*, *Paenibacillus*, *Planococcus*, *Pseudomonas*, *Rheinheimera*, *Saccharospirillum*, *Stappia*, *Thalassospira* and *Vibrio*. 23% of these strains were haloalkalophilic bacteria and belonged to the *Bacillus*, *Halobacillus*, *Halomonas*, *Idiomarina* and *Marinobacter*. This was the first study on the culturable bacteria at Gomishan wetland, an area of considerable alkaline thalassohaline ecosystem.

Key words: Gomishan wetland, Halophile, Halotolerant, 16S rDNA

* amoozegar@khayam.ut.ac.ir

Taxonomy and Biosystematics
5th Year, No. 14, Spring 2013
ISSN (Print): 2008-8906
ISSN (Online): 2322-2190

Contents

- **Body shape variation in riffle minnows (*Alburnoides eichwaldii* De Filippii, 1863) populations of Caspian Sea basin 1**
Soheil Eagderi, Esmaeil Esmaeilzadegan and Alieh Maddah

- **Population genetic structure of Iranian cichlid, *Iranocichla hormuzensis* as an only cichlidae family in Iran using microsatellite markers 2**
Zahra Ghasabshiran, Salar Dorafshan and Yazdan Keivany

- **Effects of sperm competition on genetic variation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) progeny using microsatellite markers 3**
Hossein Moradyan, Saeed Keyvanshokoo, Mustafa Muhaghegh Dolatabady and Einollah Gorjipour

- **Conservation of polymorphism in *GJB2* gene markers in Iranian population by balancing selection 4**
Rezaei Halimeh, Zahra Fazeli Attar, Marjan Mojtabavi Naeini and Sadeq Vallian Boroujeni

- **Phenetic analysis of *Trifolium resupinatum* L. (Persian clover) and *Trifolium fragiferum* L. (strawberry clover) using new microsatellite loci 5**
Maryam Haerinasab and Peyman Agahei

- **Cladistical study and assessment of evolutionary process based on morphological data in genus of *Ferula* L. in Iran 6**
Mohammad Reza Kanani, Mohammad Reza Rahiminejad Ranjbar Shahrokh Kazempour Osaloo and Valiollah Mozaffarian

- **A study of the flora of Riseh and Paqal'e area Shahrebabak of kerman, Iran7**
Atefeh Saberi, Zahra Hasanabadi, Seyed Mansour Mirtadzadini and Vahideh Nazeri

- **Isolation and identification of poly-extremophilic alkalophilic, halophilic and halotolerant bacteria from alkaline thalassohaline Gomishan wetland 8**
Azadeh Shahinpei, Mohammad Ali Amoozegar and Abbas Akhavan-Sepahi

Referees to this issue (5th Year, No. 14, Spring 2013)

We express our deep gratitude to the following faculty members of the universities and of educational-research Institutes who have co-operated in evaluation and assessment of the articles of this issue of Journal of Taxonomy and Biosystematics (TBJ):

Dr. Marahem Ashengroph

University of Kurdistan

Dr. Nastaran Jalilian

Kermanshah Agricultural and natural Resources Research Center

Dr. Salar Dorafshan

Isfahan University of Technology

Dr. Majid Sharifi Tehrani

University of Shahrekord

Dr. Majid Askari Siyahouei

Iranian Research Institute of Plant Protection

Dr. Seyed Ahmad Ghasemi

Persian Gulf University

Dr. Ahmad Gharaei

University of Zabol

Dr. Navaz Kharazian

University of Shahrkord

Dr. Ahmadreza Khosravi

University of Shiraz

Dr. Mohammad Kaboli

University of Tehran

Dr. Mohammad Reza Kanani

Shahid Beheshti University

Dr. Saeed Keyvanshokoh

Khorramshahr University of Marine Science and Technology

Dr. Majid Moradmand

Reasercher

Dr. Mohammad Javad Mehdipour Moghaddam

University of Guilan

Dr. Hamid Mir Mohammad Sadeghi

Isfahan University of Medical Sciences

Dr. Iraj Hashemzadeh Sagharlou

University of Shahrekord

Taxonomy and Biosystematics

5th Year, No. 14, Spring 2013

ISSN (Print): 2008-8906

ISSN (Online): 2322-2190

Scientific Research Journal

Editor-in-Chief:

Dr. Mohammad Reza Rahiminejad Ranjbar University of Isfahan

Editorial Board

Dr. Hamid Ejtehadi	Professor - Ferdowsi University of Mashhad
Dr. Ali Akbar Ehsanpour	Professor - University of Isfahan
Dr. Ali Asghar Maassoumi	Professor - Research Institute of Forests and Rangelands
Dr. Jamshid Darvish	Professor - Ferdowsi University of Mashhad
Dr. Mohammad Reza Rahiminejad Ranjbar	Professor - University of Isfahan
Dr. Homa Rajaei	Associate Professor - University of Shiraz
Dr. Badrodin Ebrahim Seyed Tabatabaee	Professor - Isfahan University of Technology
Dr. Mehrdad Abbasi	Associate Professor - Iranian Research Institute of Plant Protection
Dr. Hossein Fathpour	Associate Professor - University of Isfahan
Dr. Iraj Nahvi	Professor - University of Isfahan
Dr. Sadegh Vallian Boroujeni	Professor - University of Isfahan

Executive and Manuscript Manager: Fariba Hadian (Msc)

Scientific English Editor: Fereidoon Parvizian

Scientific Editor: Fariba Hadian

Professional Layout Designer: Fariba Hadian

Publisher: University of Isfahan

Address: Taxonomy and Biosystematics Office, Technology and Research Department, University of Isfahan, Hezar Jerib Street, Postal Code 81746-73441, Isfahan, Islamic Republic of Iran.

Email: TBJ@ui.ac.ir

Website: <http://uijs.ui.ac.ir/tbj>

Tel: +98-311-7934255

Fax: +98-311-7932177

Journal of Taxonomy and Biosystematics has been ranked as a **scientific-research** journal based on the document number 3/11/955 issued by the Evaluation Committee of Scientific Journals of Research and Technology Ministry in September, 2009; also it has been registered with **International Standard Serial Number (ISSN): 2008-8906** for Print and **ISSN: 2322-2190** for Online by National Library and Archives of Islamic Republic of Iran.

The complete text of this Journal is available at the following sites:

<http://uijs.ui.ac.ir/tbj>

<http://www.magiran.com>

<http://www.SID.ir>

<http://www.ISC.gov.ir>

<http://ulrichsweb.serialssolutions.com>

Publication and Lithography: University of Isfahan Publications

Publisher: University of Isfahan

Published in: Summer 2013

Taxonomy and Biosystematics

5th Year, No. 14, Spring 2013

**Published by
University of Isfahan Research Center**