



تاکسونومی و سیستماتیک

تاکسونومی و سیستماتیک

علمی-پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه اصفهان

سال پنجم - شماره هفدهم - زمستان ۱۳۹۲

شماره: ۸۹۰۶-۲۰۰۸

سال پنجم - شماره هفدهم - زمستان ۱۳۹۲

Taxonomy and Biosystematics

5th Year, No. 17

Winter 2013

ISSN: 2008-8906

- ۸-۱ تحلیل ریخت‌شناسی هندسی فلس ماهیان برای شناسایی جنس، گونه و جمعیت‌ها، مطالعه موردی خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) سیده زحرا طاهری، سید ابیگر، ابرح هاشم‌زاده سقرلو و اصغر عدلی
- ۲۲-۹ ساختار ژنتیکی شاه‌کولی جنوبی (Alburnus mossalensis Heckel, 1843) با استفاده از نشانگر ریزماهوره، در حوضه دجله زهرا شافعی، سalar Dorafshan, Yazdan Keivany and Seyed Ahmad Qasemi
- ۲۳-۱۲ معرفی برخی گونه‌های حشرات راسته طیاره‌مانندها (Insecta: Odonata) از شمال ایران .. الهام یوسفی لورکی، فاطمه راستی و منصوره شایان مهر
- ۲۲-۲۳ بررسی دانه پراکنش، تراکم و زیست‌شناسی زادآوری قرقاول پال نقره‌ای (*Phasianus colchicus principalis*, Sclater, 1885) در شمال‌شرق ایران نسرین کولانفر و منصور علی آبادیان
- ۵۴-۶۵ بررسی گونه‌های *Sargassum* از بخش‌های *Malaecarpiceae* و *Acanthocarpiceae* (Phaeophyceae و Sargassaceae) در سواحل جنوبی ایران منصوره نسبی، سعید انصاریزاده و علیرضا بلالی دهکردی
- ۷۲-۵۵ تاکسونومی عددی سرده شیپروی معطر وحشی (*Masthola*, Brassicaceae) در شمال‌شرق ایران با استفاده از صفات ریخت‌شناسی مرگان رشید ترانلو، جمیل واعظی، حمید اجتهادی، فریاد معماربانی و محمدرضا جوهرچی
- ۸۷-۷۲ مقایسه الگوی PCR-RFLP با توالی‌یابی مستقیم ناحیه ITS نشانده‌های هیرکانی حامد یوسف‌زاده، حمید بیبا و لیامت حسین‌زاده کلانگر
- ۹۴-۸۳ مقایسه روش‌های FTIR و تحلیل توالی ژن 16S rDNA در شناسایی و رده‌بندی باکتری‌های متیلوتروف اسحاق زمانی، حمید بواری و گیتی امتیازی
- ۱۰۴-۹۵ بررسی مولکولی ژن *lucA* برای شناسایی باکتری‌های نورافشان دریای مازندران محبتی محسنی و محدث صالح‌نوری

- Geometric and morphometric analysis of fish scales to identity genera, species and populations case study: the Cyprinid family 1 Seyedeh Narjes Tabatabaei, Sobell Eagderi, Iraj Hashemzadeh Segherloo and Asghar Abdoli
- Genetic structure of Mosul bleak (*Alburnus mossalensis* Heckel, 1843) using microsatellite marker in Tigris basin 2 Zahra Shafaei, Salar Dorafshan, Yazdan Keivany and Seyed Ahmad Qasemi
- Introduction of some Odonata species (Insecta) from northern Iran ... 3 Elham Yoosefi Lafooraki, Fatemeh Rasekhi and Masoumeh Shayanmehr
- Distribution, density and biological breeding of white wing pheasant (*Phasianus colchicus principalis*, Sclater, 1885) in Northeast of Iran 4 Nasrin Kayvanfar and Mansour Alibadian
- Revision of the *Sargassum* species (Sagassaceae, Phaeophyceae) from Acanthocarpiceae and Malaecarpiceae sections in Iranian southern coasts 5 Masoumeh Shams, Saeed Afsharzadeh and Gholamreza Balali Dehkordi
- Numerical taxonomy of the genus *Mathiola* (Brassicaceae) in Northeast of Iran based on morphological traits 6 Mozhgan Rashid Taranloo, Jamil Vaezi, Hamid Ejtchadi, Farshid Memariani and Mohammad Reza Joharchi
- Comparison of PCR-RFLP pattern with sequencing analysis of the ITS region of Hyrcanian's *Tilia* 7 Hamed Yousefzadeh, Hamid Bina and Abasalt Housseinzadeh Celagar
- Comparison of FTIR and 16S rDNA sequencing methods for identification and taxonomy of methylotroph bacteria 8 Isaac Zamani, Majid Bouzari and Giti Emiazari
- Molecular investigation of *lucA* gene to identify luminescent bacteria in Caspian sea 9 Mojtaba Mohtseni and Mohaddeseh Salehghamari

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مجله کسولولوژی و سوسپتالوژی

علمی-پژوهشی

سال پنجم - شماره هفدهم - زمستان ۱۳۹۲

مجله 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 زیر نمایه و فهرست می‌شود:

http://uijs.ui.ac.ir/tbj	پایگاه اختصاصی مجله
http://www.magiran.com	بانک اطلاعات نشریات کشور
http://www.ISC.gov.ir	پایگاه استنادی علوم جهان اسلام
http://www.sid.ir	پایگاه اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی
http://www.ebscohost.com	ابسکو: میزبان پایگاه‌های اطلاعاتی
http://ulrichsweb.serialssolutions.com	اولریخ: راهنمای بین‌المللی نشریات ادواری
http://journals.indexcopernicus.com	ایندکس کوپرنیکوس (فهرست مجلات برتر)
http://www.doaj.org	دوآج: فهرست مجلات پژوهشی با دسترسی آزاد

چاپ و لیتوگرافی: انتشارات دانشگاه اصفهان

ناشر: دانشگاه اصفهان

انتشار: زمستان ۱۳۹۲

تاکسونومی و بیوسیستماتیک

سال پنجم - شماره هفدهم - زمستان ۱۳۹۲

شماره استاندارد بین‌المللی (نسخه چاپی): ۸۹۰۶-۲۰۰۸

شماره استاندارد بین‌المللی (نسخه الکترونیک): ۲۱۹۰-۲۳۲۲

علمی-پژوهشی

صاحب امتیاز: معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان

سر دبیر: دکتر محمدرضا رحیمی نژاد رنجبر
استاد - 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

هدف

دانشگاه اصفهان با هدف معرفی و نشر آخرین یافته‌های علمی پژوهشگران دانشگاه‌ها و مؤسسات علمی در زمینه تاکسونومی و بیوسیستماتیک با تأکید بر خزانه وراثتی جانداران (یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها)، مجله علمی-پژوهشی **تاکسونومی و بیوسیستماتیک** با عنوان انگلیسی **Taxonomy and Biosystematics** را به صورت فصلنامه منتشر می‌نماید.

محورهای موضوعی مجله

مجله تاکسونومی و بیوسیستماتیک، مقاله‌های اصیل پژوهشی در زمینه‌های: معرفی تاکسون‌های جدید، مرور نامگذاری تاکسون‌ها، طبقه‌بندی تاکسون‌ها، معرفی روش‌های نوین ایجاد و تحلیل داده‌ها، ژن اکولوژی، ژنتیک جمعیت‌ها و تنوع وراثتی، تنوع زیستی و فیلوژنی تاکسون‌ها را پس از داوری دقیق به صورت مقاله کامل (full paper) و مقاله کوتاه (short paper) به چاپ می‌رساند.

قوانین حق نشر

۱. مقالاتی که برای بررسی به این مجله ارسال می‌گردد نباید قبلاً در جایی به چاپ رسیده باشد و یا همزمان به مجلات دیگر ارائه شده باشد. همچنین، نایستی نتایج آن در گردهمایی‌ها ارائه شده باشد.
۲. مسؤولیت صحت مطالب مقاله بر عهده نویسنده مسؤول مقاله است.
۳. تعداد و ترتیب اسامی نگارندگان بر اساس توافق بین آنها و نویسنده مسؤول مقاله صورت می‌گیرد.
۴. عدم رعایت شیوه نگارش مقاله باعث عدم پذیرش یا کُندی مراحل پذیرش مقاله خواهد شد.
۵. مجله در پذیرش، رد و اصلاح مقاله بر اساس قوانین مصوب این مجله عمل می‌نماید.
۶. مقاله‌های دریافت شده توسط دبیران و داوران متخصص بررسی می‌شود و پس از پذیرش علمی توسط هیأت تحریریه با رعایت نوبت به چاپ می‌رسد.

تدوین مقاله در یک نگاه

متن مقاله بایستی به زبان فارسی باشد، رعایت قواعد دستور زبان فارسی و رسا بودن جملات مورد توجه است.

مقاله کامل (full paper) به ترتیب شامل: عنوان، نام نگارندگان، وابستگی سازمانی نگارندگان، چکیده فارسی، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج، بحث، جمع‌بندی، سپاسگزاری، منابع، Title، Author(s) Name(s)، Author(s) Affiliation(s)، Abstract و Key words باشد و حداکثر در ۱۵ صفحه در فرمت نهایی مجله تنظیم شود.

مقاله کوتاه (short paper) کاملاً شبیه مقاله کامل است به طوری که دارای: عنوان، نام نگارندگان، وابستگی سازمانی نگارندگان، چکیده فارسی، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج، بحث، جمع‌بندی، سپاسگزاری، منابع، Title، Author(s) Name(s)، Author(s) Affiliation(s)، Abstract و Key words است، با این تفاوت که بدون بخش‌بندی و حداکثر در ۴ صفحه تنظیم می‌شود.

تدوین مقاله با شرح جزئیات (رعایت ترتیب در متن)

فایل مقاله با نرم افزار Microsoft Office Word در فرمت ذخیره 2003، در کاغذ A4، با حاشیه‌های ۳ سانتی متر از چهار سوی، فاصله خطوط ۱ (single) و به صورت یک ستونی تهیه شود.

عنوان: فارسی: 16 B Zar Bold، انگلیسی: 14 Times New Roman Bold

نام نگارندگان: فارسی: 11 B Zar، انگلیسی: 9 Times New Roman

درج شماره مربوط به وابستگی سازمانی هر نگارنده پس از نام نگارنده به صورت superscript

درج ستاره (*) برای نویسنده مسؤول (Corresponding Author)

وابستگی سازمانی نگارندگان: فارسی: 10 B Zar و انگلیسی: 8 Times New Roman

درج شماره مربوط به وابستگی سازمانی هر نگارنده پیش از نشانی به صورت superscript

نشانی پست الکترونیک نگارنده مسؤول: 10 Times New Roman

چکیده: فارسی: 11 B Zar، انگلیسی: 9 Times New Roman

حداقل ۱۰۰ و حداکثر ۲۵۰ واژه، از به کار بردن واژه‌های اختصاری اجتناب شود.

واژه‌های کلیدی: حداکثر ۷ واژه مرتبط و مرتب شده بر اساس حروف الفبا

متن مقاله: به ترتیب شامل: مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج، بحث، جمع‌بندی و سپاسگزاری است. فارسی: 13 B Zar، انگلیسی:

11 Times New Roman

از درج پاورقی برای بیان توضیحات انگلیسی و فارسی و بالعکس خودداری شود و در صورت نیاز، در درون پرانتز و در متن مقاله آورده شود.

جدول‌ها

جدول‌ها به همراه توضیحات آنها در متن مقاله آورده شود.

شماره گذاری و توضیحات جدول‌ها به صورت بالانویس باشد. فارسی: 11 B Zar، انگلیسی: 9 Times New Roman

فرمت جدول‌ها در بخش Text wrapping، به صورت None انتخاب شود.

جدول‌های طولانی به صورت جدولی یکپارچه طراحی شود.

شکل‌ها

شکل‌ها به همراه توضیحات آنها در متن مقاله آورده شود.

شماره گذاری و توضیحات شکل‌ها به صورت زیرنویس باشد. فارسی: 11 B Zar، انگلیسی: 9 Times New Roman

فرمت شکل‌ها در بخش Layout، به صورت In line with text انتخاب شود.

شکل‌ها از حالت گروه‌بندی (group) خارج شود و به صورت یکپارچه باشد.

شکل‌هایی که از جنس نمودار هستند به صورت دو بعدی، سیاه و سفید، بدون سایه، با بافت ساده و بدون خطوط افقی طراحی شوند.

شکل‌هایی که از جنس تصویر هستند به صورت دو بعدی، بدون سایه، با کیفیت بسیار بالا ارسال شوند.

زیرنویس شکل‌ها و بالانویس جدول‌ها به یکی از دو صورت زیر تنظیم شود:
مقادیر، میانگین ... تکرار $\pm SE$ (یا StD یا انحراف معیار یا خطای معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون (دانکن یا توکی یا ...) است.

مقادیر، میانگین ... تکرار $\pm SE$ (یا StD یا انحراف معیار یا خطای معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P < XXX$ است.

منابع (بر اساس شیوه‌نامه انجمن روان‌شناسی آمریکا، APA)

منابع استفاده شده در سراسر مقاله فقط به زبان انگلیسی و سال میلادی باشد.

منابعی که در اصل فارسی زبان هستند، با درج عبارت (in Persian) در انتها مشخص شوند.

منابع استفاده شده در متن مقاله در چهار مورد با فهرست منابع کاملاً منطبق باشد: استفاده شدن یا نشدن در متن یا انتها، داشتن املا صحیح و یکسان، داشتن یا نداشتن همکار، یکسان بودن سال.

استناد در متن (references in text): به صورت نام نویسنده یا نویسندگان (بدون نام کوچک) و سال انتشار نوشته شود.

ابتدای جمله

Ranjbar and Mahmoudian (۲۰۱۳) با مطالعه چهار گونه از جنس ...

Ashrafzadeh و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی برخی ویژگی‌های بوم‌شناختی گونه جریبل بلوچی ...

وسط جمله

Mehdipour Moghaddam و همکاران (۲۰۱۲) برای شناسایی گونه‌هایی جدید از باکتری‌های ...

نتایج به دست آمده از بررسی‌های Kharazian (۲۰۱۰) بر روی طبقه‌بندی و ریخت‌شناسی ...

انتهای جمله (از قدیم به جدید)

(Ranjbar and Mahmoudian, 2013; Mehdipour Moghaddam *et al.*, 2012; Kharazian, 2010; Ashrafzadeh *et al.*, 2010)

عبارت *et al* بایستی به صورت مورب باشد (به دلیل لاتین بودن).

منابع (references in list)

منابع بر اساس حروف الفبا مرتب شود و به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر به صورت Hanging تورفتگی داشته باشد. 11 Times New Roman

استناد به مقاله (paper)

به ترتیب شامل: عنوان نویسنده یا نویسندگان، سال، عنوان مقاله، عنوان مجله، شماره مجلد، شماره صفحات است (به علامت‌های جدا کننده ویرایشی توجه شود).

پیش از عنوان آخرین نویسنده، واژه ربط and استفاده شود (استفاده از & مجاز نیست).

برای استناد به مقاله‌هایی که هنوز چاپ نشده‌اند به جای سال، از عبارت (in press) استفاده شود.

عنوان مقاله با حروف کوچک نوشته شود، به استثنای نخستین حرف از: نخستین واژه، اسامی خاص و اسامی علمی.

عنوان مجله به صورت کامل (نه مخفف) نوشته شود.

حروف نخستین عنوان مجله به صورت بزرگ (capital) نوشته شود.

Gholipour, A. and Sonboli, A. (2013) Rediscovery of *Acorus calamus* (Acoraceae) in Iran. *Taxonomy and Biosystematics* 5(15): 113-116 (in Persian).

Takano, A., Gisil, J. and Suleiman, M. (2013) Floral size variation causes differentiation of pollinators and genetic parameters in *Alpinia neuwenhuizii*, a flexistylous ginger (Zingiberaceae). *Plant Systematics and Evolution* 299(5): 865-871.

استناد به کتاب (book)

با توجه به اینکه ترجمه اغلب کتاب‌ها بدون دریافت مجوز از نویسنده و ناشر اصلی انجام می‌شود، استفاده از آنها در مجامع بین‌المللی موجب بروز مشکلات عدیده‌ای می‌شود. لذا، استناد به ترجمه‌های فارسی مجاز نیست. در صورت نیاز، اصل کتاب تهیه، مطالعه و به آن ارجاع داده شود.

به ترتیب شامل: عنوان نویسنده یا نویسندگان، سال، عنوان کتاب، شماره ویرایش در صورت وجود، نام انتشارات، نام نخستین شهر محل انتشارات.

Ghahreman, A. and Attar, F. (1999) Biodiversity of plant species in Iran. Tehran University Press, Tehran (in Persian).

Stace, C. A. (1989) Plant taxonomy and biosystematics. Edward Arnold, London.

استناد به بخشی از کتاب (chapter in book) به طوری که هر بخش دارای نویسنده جداگانه باشد:

به ترتیب شامل: عنوان نویسنده یا نویسندگان بخش، سال، عنوان بخش، استفاده از واژه In: عنوان اصلی کتاب، نام ویراستار اصلی، شماره ویرایش در صورت وجود، شماره صفحه آغاز و پایان بخش، نام انتشارات، نام نخستین شهر محل انتشارات. توضیح: اگر ویراستار اصلی (chief editor) یک نفر باشد، از Ed. و اگر بیش از یک نفر باشد (chief editors) از Eds. استفاده می‌شود.

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 Rudolf, W.) 2: 164-187. Paul Parey, Berlin and Humburg.

استناد به کتاب چند جلدی دارای ویراستار اصلی با تاریخ نشر چند ساله

Rechinger, K. H. (Ed.) (1963-1998) Flora Iranica. vols. 1-176. Akademische Druck-U Verlagsanstalt, Graz.

Townsend, C. C. and Guest, E. (1966-1985) Flora of Iraq. vols. 1-9. Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Baghdad.

استناد به یک جلد از کتاب چند جلدی دارای ویراستار اصلی

Podlech, D., Zarre, Sh. and Maassoumi, A. A. (2001) Papilionaceae IV, Astragalus II. In: Flora Iranica (Ed. Rechinger, K. H.) vol. 175. Akademische Druck-U Verlagsanstalt, Graz.

استناد به پایان‌نامه کارشناسی ارشد و رساله دکتری

به ترتیب شامل: نام نویسنده، سال، عنوان پایان‌نامه، مقطع تحصیلی، نام دانشگاه، نام شهر، نام کشور.

Barzehkar, Gh. (1995) Flora and plant communities with their distribution according to ecological properties in Noor Forest Park. MSc thesis, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (in Persian).

Von Konrat, M. (2003) A biosystematic study of the liverwort genus *Frullania Raddi*: encompassing a worldwide monograph of subg. *microfrullania* (Schust.) Schust.; a revision of the New Zealand species and study of subsidiary species. PhD thesis, The University of Auckland, Auckland, New Zealand.

استناد به Patent

به ترتیب شامل: نام نویسنده، سال، عنوان، نام کشور و شماره patent.

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

استناد به همایش (سمینار، سمپوزیوم، کنگره، میتینگ و ...)

به ترتیب شامل: نام نویسنده، سال انتشار، عنوان مقاله، دوره و نام همایش، نام محل برگزاری، نام شهر، نام کشور.

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.

استناد به مقاله کامل همایش (سمینار، سمپوزیوم، کنگره، میتینگ و...): **Proceedings**

به ترتیب شامل: نام نویسندگان، سال انتشار، عنوان مقاله، دوره و نام همایش، نام محل برگزاری، نام شهر، نام کشور.

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 (in Persian).

Somsap, V., Atkins, C. and Jones, M. G. K. (1993) Tissue culture for transformation of narrow- and broad-leaved lupins. In: Proceeding of the 33rd Annual General Meeting of Australian Society of Plant Physiologist, University of Western Australia, Perth, Australia.

استناد به منابع با پدیدآورنده سازمانی

Iran Meteorological Organization (2007) Statistical data of Gonabad synoptic station. Retrieved from <http://www.weather.ir>. On: 30 October 2007 (in Persian).

استناد به اینترنت

استناد به نشانی‌های اینترنتی تقریباً فاقد اعتبار است، به استثنای نشانی‌هایی که محتوای آنها به صورت " پایگاه داده " قابل استفاده است، مانند: IPNI و IPCN. در مواقعی که ناگزیر از استفاده محدود از آن باشد نام نویسنده، زمان چاپ و زمان استخراج از پایگاه درج گردد.

IPNI, The International Plant Names Index. Retrieved from <http://www.ipni.org>. On: 31 March 2012.

ISTA, International Seed Testing Association. Retrieved from <http://www.seedtest.org/en/home.html> On: 16 May 2013.

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.

Title: دقیقاً منطبق با عنوان فارسی مقاله باشد. 14 Times New Roman Bold

Author(s) Name(s): دقیقاً منطبق با نام نگارندگان فارسی باشد. 11 Times New Roman Bold

درج شماره مربوط به وابستگی سازمانی هر نگارنده پس از نام نگارنده به صورت superscript

درج ستاره (*) برای نویسنده مسؤول (Corresponding Author)

Author(s) Affiliation(s): دقیقاً منطبق با وابستگی سازمانی فارسی باشد. درج شماره مربوط به وابستگی سازمانی هر نگارنده

پیش از نشانی به صورت 10 Times New Roman .superscript

Email: 10 Times New Roman

Abstract: دقیقاً منطبق با چکیده فارسی باشد. 12 Times New Roman

Key words: دقیقاً منطبق با واژه‌های کلیدی فارسی باشد. 12 Times New Roman

ارسال مقاله

فایل مقاله با نرم‌افزار Microsoft Office Word در فرمت ذخیره 2003 تنظیم و به همراه فایل پیش‌نیاز (copyright) توسط عضو هیأت علمی در پایگاه اختصاصی مجله تاکسونومی و بیوسیستماتیک به نشانی <http://uijs.ui.ac.ir/tbj> ارسال گردد.

تماس با مجله تاکسونومی و بیوسیستماتیک

شماره تماس: +۹۸-۳۱۱-۷۹۳۴۲۵۵

دورنگار: +۹۸-۳۱۱-۷۹۳۲۱۷۷

نشانی پست الکترونیک: tbj@ui.ac.ir

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

نشانی: اصفهان - خیابان هزار جریب - دانشگاه اصفهان - ساختمان کتابخانه مرکزی - طبقه دوم - اداره چاپ، انتشارات و مجلات -

دفتر مجله تاکسونومی و بیوسیستماتیک، کدپستی: ۸۱۷۴۶۷۳۴۴۱

معرفی داوران علمی

سال پنجم - شماره هفدهم - زمستان 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 اصفهان	دکتر زهرا اعتمادی‌فر
دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر	مهندس محمدرضا اشرف‌زاده
دانشگاه اصفهان	دکتر رحمان امام‌زاده
دانشگاه شهید باهنر کرمان	دکتر فیروزه بردبار
دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان	دکتر کیوان بهشتی مآل
دانشگاه تهران	دکتر هادی پورباقر
مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور	مهندس حسین حیدری
دانشگاه شهید باهنر کرمان	دکتر موج خالقی
دانشگاه صنعتی اصفهان	دکتر مهدی رحیم ملک
دانشگاه اصفهان	دکتر فاتح رحیمی
مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران	دکتر حبیب زارع
پژوهشگر	دکتر علی سلطانی‌پور
دانشگاه شهید بهشتی	دکتر ندا سلطانی تیرانی
دانشگاه هرمزگان	دکتر ایمان سوری‌نژاد
دانشگاه شهرکرد	دکتر مجید شریفی تهرانی
دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار	دکتر آرش شکوری
دانشگاه شیراز	دکتر صابر صادقی
دانشگاه فردوسی مشهد	دکتر فاطمه طباطبایی یزدی
مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور	دکتر مجید عسکری سیاهویی
دانشگاه گیلان	دکتر مرضیه بیگم فقیر
دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر	دکتر سعید کیوان شکوه
دانشگاه شهید باهنر کرمان	دکتر سید مسعود مجدزاده
دانشگاه اصفهان	دکتر حسین مدنی
دانشگاه تبریز	دکتر هوشنگ نصرتی

مجله علمی - پژوهشی تاکسونومی و بیوسیستماتیک

سال پنجم - شماره هفدهم - زمستان ۱۳۹۲

شماره استاندارد بین‌المللی (نسخه چاپی): ۲۰۰۸-۸۹۰۶

شماره استاندارد بین‌المللی (نسخه الکترونیک): ۲۳۲۲-۲۱۹۰

فهرست

- تحلیل ریخت‌سنجی هندسی فلس ماهیان برای شناسایی جنس، گونه و جمعیت‌ها، مطالعه موردی خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) ۸-۱
سیده نرجس طباطبایی، سهیل ایگدری، ایرج هاشم‌زاده سقرلو و اصغر عبدلی
- ساختار ژنتیکی شاه‌کولی جنوبی (*Alburnus mossulensis* Heckel, 1843) با استفاده از نشانگر ریزماهوره، در حوضه دجله ۲۲-۹
زهرا شفیعی، سالار درافشان، یزدان کیوانی و سید احمد قاسمی
- معرفی برخی گونه‌های حشرات راسته طیاره‌ماندها (Insecta: Odonata) از شمال ایران ۳۲-۲۳
الهام یوسفی لفورکی، فاطمه راسخی و معصومه شایان مهر
- بررسی دامنه پراکنش، تراکم و زیست‌شناسی زادآوری قرقاول بال نقره‌ای (*Phasianus colchicus* principalis, Sclater, 1885) در شمال شرق ایران ۴۴-۳۳
نسرین کیوانفر و منصور علی آبادیان
- بررسی گونه‌های *Sargassum* از بخشه‌های Acanthocarpiceae و Malacocarpiceae (Phaeophyceae و Sargassaceae) در سواحل جنوبی ایران ۵۴-۴۵
معصومه شمس، سعید افشارزاده و غلامرضا بلالی دهکردی
- تاکسونومی عددی سرده شب‌بوی معطر وحشی (*Matthiola*, Brassicaceae) در شمال شرق ایران با استفاده از صفات ریخت‌شناسی ۷۲-۵۵
مژگان رشید ترانلو، جمیل واعظی، حمید اجتهادی، فرشید معاریانی و محمدرضا جوهرچی
- مقایسه الگوی PCR-RFLP با توالی‌یابی مستقیم ناحیه ITS نمدارهای هیرکانی ۸۲-۷۳
حامد یوسف‌زاده، حمید بینا و اباصلت حسین‌زاده کلاگر
- مقایسه روش‌های FTIR و تحلیل توالی ژن 16S rDNA در شناسایی و رده‌بندی باکتری‌های متیلوتروف ۹۴-۸۳
اسحاق زمانی، مجید بوذری و گیتی امتیازی
- بررسی مولکولی ژن *luxA* برای شناسایی باکتری‌های نورافشان دریای مازندران ۱۰۴-۹۵
مجتبی محسنی و محدثه صالح‌قمیری

تحلیل ریخت‌سنجی هندسی فلس ماهیان برای شناسایی جنس، گونه و جمعیت‌ها مطالعه موردی خانواده کپورماهیان (Cyprinidae)

سیده نرجس طباطبایی^۱، سهیل ایگدری^{۱*}، ایرج هاشم‌زاده سقرلو^۲ و اصغر عبدلی^۳
^۱ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
^۲ گروه شیلات و محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
^۳ گروه زیستی و مدیریت اکوسیستم، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

شناسایی گونه‌ها و جمعیت‌های ماهیان با استفاده از فلس روشی غیر مخرب، سریع و کم هزینه است. از اینرو، این مطالعه با هدف بررسی امکان به کارگیری روش ریخت‌سنجی هندسی بر پایه لندمارک بر روی فلس ماهیان برای شناسایی سریع گونه‌ها و جمعیت‌های ماهیان و مقایسه آن با روش مشابه محیط پیرامونی فلس با استفاده از لندمارک‌های کاذب به اجرا در آمد. برای این منظور، از فلس‌های یک جمعیت از سس ماهی بزرگ سر (*Luciobarbus capito*)، چهار جمعیت از ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldii*) و دو جمعیت از ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*)، متعلق به خانواده کپورماهیان استفاده شد. بر روی تصاویر گرفته شده از فلس‌ها در روش در ریخت‌سنجی لندمارک پایه تعداد ۱۷ لندمارک و در روش نیمه‌لندمارک تعداد ۲۳ نیمه‌لندمارک تعریف شد سپس، با نرم‌فزار TpsDig2 رقومی شدند. داده‌های حاصل پس از تحلیل پروکراست، با استفاده از تحلیل چند متغیره تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تجزیه همبستگی کانونیک و تحلیل خوشه‌ای بررسی شدند. نتایج استفاده از هر دو روش (۷ و ۲۳ عدد لندمارک) نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین شکل فلس‌های هر سه گونه وجود دارد ($P < 0.001$) ولی تفاوت بین جمعیت‌های آنها معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). بنابراین، نتایج نشان داد که تعداد اندک لندمارک نیز می‌تواند به خوبی اختلافات میان اشکال فلس را ظاهر نماید. بر اساس نتایج همچنین می‌توان بیان کرد که فلس هر گونه دارای الگوی شکلی منحصر به فردی است، که می‌تواند به عنوان کلید شناسایی در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: ریخت‌سنجی لندمارک پایه، شکل فلس، سس ماهی، ماهی سفید، ماهی خیاطه

مقدمه

آنها از قبیل رشد، مرگ و میر، همآوری، روابط تغذیه‌ای و چرخه حیات ضروری است (Ibanez et al., 2007). خصوصیات ریختی از قبیل ویژگی‌های شمارشی،

شناسایی گونه‌ها و جمعیت‌های ماهیان در حفاظت از تنوع زیستی و تحقیقات مربوط به ویژگی‌های زیستی

بهبتر زیستی نتایج کمک کند. نکته‌ای که روش‌های مبتنی بر لندمارک گذاری را از سایر روش‌ها جدا می‌کند این است که در این روش جایگاه‌های مشترک بین ساختارها در تشخیص تفاوت‌ها استفاده می‌شود که بنیان زیستی دارد و به عبارت دیگر هم‌ساخت (هم‌ساخت) هستند (Ibanez et al., 2007).

حدود نیمی از ۱۸۰ گونه ماهیان آب‌های داخلی ایران به خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) تعلق دارند (Coad, 2012). اعضای این خانواده از جنبه‌های پرورشی، اقتصادی و علمی بسیار حایز اهمیت هستند (Nelson, 2006) و مطالعات تبارشناسی، بوم‌شناسی، فیزیولوژیکی و پراکنش آنها دارای اهمیت فراوانی است (Chen and Mayden, 2009). حال این پرسش مطرح است که آیا با به کارگیری روش ریخت‌سنجی هندسی بر پایه لندمارک به عنوان یک روش تشخیص سریع، امکان شناسایی گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف کپورماهیان از روی شکل فلس امکان‌پذیر است؟ آیا برای تفکیک و شناسایی گونه‌ها و جمعیت‌های ماهیانی که همگی دارای فلس مشابه (برای مثال دایره‌ای یا لوزی) هستند، به کارگیری روش ریخت‌سنجی هندسی بر مبنای نقاط هم‌ساخت (با تعداد کمتری لندمارک) کفایت می‌کند و یا اینکه نیاز است تعداد لندمارک‌های بیشتری مشابه روش‌های خط سیر پیرامونی مورد استفاده قرار گیرد؟ تعداد اندک متغیرها خود مزیتی در تحلیل سریع است، چرا که با توصیف مختصری از شکل فلس، فضاهاى چند متغیره حاصل به راحتی قابل تصور است و در ضمن در تحلیل تابع تشخیص، میزان خطا نیز به حداقل می‌رسد (Ibanez et al., 2007).

بنابراین، این مطالعه با هدف امکان‌به‌کارگیری روش ریخت‌سنجی هندسی بر پایه لندمارک در شناسایی

زیست‌سنجی شکل بدن و شکل اتولیت به طور گسترده در شناسایی و تشخیص گونه‌ها و جمعیت‌های ماهیان به کار برده می‌شود (Cardin, Ihssen et al., 1981; Poulet et al., 2005; 2000). در روش‌های سنتی، شناسایی گونه‌ها و حتی جمعیت‌ها بر پایه ویژگی‌های قابل اندازه‌گیری ریختی و شمارشی انجام می‌شود (Murta, 2000; Swain and Foote, 1999). اخیراً نیز در این زمینه، روش‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما این روش‌ها علاوه بر هزینه‌بر بودن، به راحتی در شرایط میدانی در دسترس و قابل کاربرد نیستند.

تفکیک گونه‌ها و حتی جمعیت ماهی‌ها با استفاده از شکل (shape) فلس آنها در برخی از گروه‌های ماهیان گزارش شده است (Poulet et al., 2005; Ibanez et al., 2007). برای تفکیک گونه و جمعیت‌های ماهیان از روش‌های: تحلیل شکل فلس، fourier analysis (خط سیر پیرامونی) (Poulet et al., 2005) و Wavelets (روش جایگزین خط سیر پیرامونی) استفاده شده است (Watkinson and Gillis, 2005). روش پیشنهادی دیگر، بر پایه داده‌های حاصل از لندمارک‌ها، در روش ریخت‌سنجی هندسی است. در روش ریخت‌سنجی هندسی بر پایه لندمارک، داده‌های اشکال زیستی، مختصات نقاط لندمارک است. این روش به لحاظ وجود امکان تحلیل آماری فضاهاى شکلی و قدرت آماری مناسب در تفکیک گونه‌ها و جمعیت‌ها بر اساس شباهت‌های ریختی به طور گسترده در مباحث زیست‌شناسی عمومیت یافته است (Chen et al., 2005; Recasens et al.; Crews and Hedin, 2006; al., 2006). در این روش مصورسازی گرافیکی نتایج و یافته‌های آماری امکان‌پذیر است و می‌تواند به تفسیر

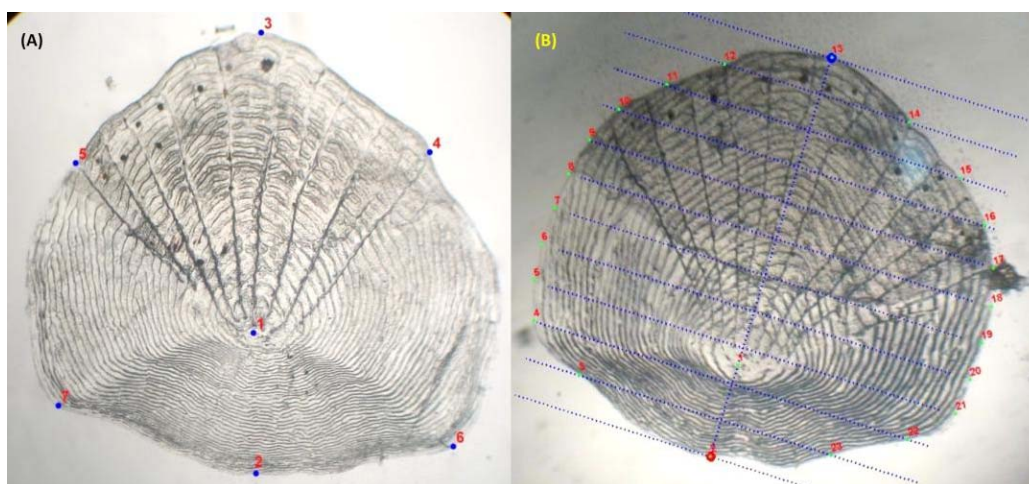
توجه به اندازه در زیر استریومیکروسکوپ یا لوپ Leica MS-5 مجهز به دوربین دیجیتال Canon با قدرت تفکیک ۵ مگاپیکسل عکس‌برداری شدند. با توجه به هدف این تحقیق، در روش اول تعداد ۷ لندمارک با توجه به ویژگی‌های مشترک به عنوان نقاط ثابت و هم‌ساخت فلس‌ها تعریف شد (شکل ۱-۱A). در روش دیگر و به منظور استخراج دقیق‌تر مختصات محیط پیرامونی فلس‌ها، با نرم‌افزار MakeFan نسخه ۶ میان ۲ جایگاه رأسی‌ترین و قاعده‌ای‌ترین نقاط فلس در راستای مرکز، خطوط موازی رسم و ۲۳ لندمارک کاذب در محل تقاطع با محیط پیرامونی تعریف گردید (شکل ۱-۱B).

لندمارک‌گذاری بر روی تصاویر با نرم‌افزار tpsDig2 انجام شد (Rohlf, 2005). روی هم‌گذاری جایگاه لندمارک نمونه‌ها بر اساس تحلیل پروکراست (GPA) به منظور حذف اختلافات غیرشکل شامل مقیاس، جهت و موقعیت تصاویر صورت پذیرفت (Zelditch, 2004). سپس، داده‌های حاصل با استفاده از تحلیل چند متغیره تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA)، تحلیل همبستگی کانونیک (CVA)، تحلیل واریانس چندمتغیره (Manova) و تحلیل خوشه‌ای با نرم‌افزارهای MorphoJ و Past تحلیل شدند. بوت‌استرپ تحلیل خوشه‌ای با ۱۰۰۰۰ تکرار اجرا و درصد تکرار حمایت‌کننده هر شاخه در دندوگرام آورده شد. مصورسازی تغییرات شکل فلس هر جمعیت بر اساس شکل میانگین (consensus configuration) هر گروه از ماهیان در تحلیل خوشه‌ای و انحراف از میانگین شکل فلس گونه‌ها از یکدیگر با استفاده از شبکه تغییر شکل با استفاده از نرم‌افزارهای MorphoJ و tpsSpline نسخه ۱/۲۰ انجام شد (Rohlf, 2004; Klingenberg, 2011).

گونه‌ها و جمعیت‌های ماهیان از روی شکل فلس و مقایسه آن با روش مشابه محیط پیرامونی با استفاده از لندمارک‌های کاذب انجام شد. از این رو، مطالعه موردی بر روی خانواده کپورماهیان شامل یک جمعیت از سس ماهی بزرگ سر (*Luciobarbus capito*)، چهار جمعیت از ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldii*) و دو جمعیت ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*)، که همگی دارای فلس‌های دایره‌ای (cycloid) هستند، به اجرا درآمد. در صورت مثبت بودن پاسخ پرسش‌های فوق، امکان شناسایی گونه‌ها بر اساس شکل فلس به عنوان روشی غیرمخرب برای شناسایی ماهیان، به ویژه گونه‌های نادر و در معرض خطر، با امکان برگرداندن آنها به آب و همچنین استفاده از بقایای فلس موجود در طبیعت و یا مدفوع حیوانات ماهیخوار برای شناسایی گونه و جمعیت ماهیان وجود خواهد داشت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، از فلس ۲۶ نمونه سس ماهی بزرگ سر، ۱۲۰ نمونه ماهی خیاطه، شامل جمعیت‌های رودخانه‌های قره‌چای (۳۰ عدد)، تجن (۳۰ عدد)، جاجرود (۳۰ عدد) و چشمه علی دامغان (۳۰ عدد) و ۴۹ نمونه ماهی سفید از رودخانه‌های شیروود (۲۰ عدد) و گهرباران (۲۹ عدد) استفاده شد. تعداد ۱۰-۱۵ عدد فلس از سمت چپ ماهیان، بین باله پشتی و خط جانبی برداشته و در پاکت‌های کاغذی قرار داده شدند. فلس‌ها به ترتیب با استفاده از محلول پتاس ۵ درصد و آب مقطر به مدت ۳-۵ دقیقه شستشو و سپس برای مطالعات بعدی بین دو لام تثبیت شدند (Poulet et al., 2005). از آنجا که هدف این تحقیق تشخیص سریع است، تنها یک عدد فلس از هر ماهی استفاده شد. فلس‌ها با



شکل ۱- (A) جایگاه ۷ لندمارک تعیین شده بر روی فلس ماهیان: ۱- مرکز فلس، ۲- پایین ترین نقطه در راستای خطی که از مرکز عبور می کند، ۳- بالاترین نقطه در راستای خطی که از مرکز عبور می کند، ۴- محل تقاطع جلویی ترین کانال شعاعی سمت راست با حاشیه فلس، ۵- محل تقاطع جلویی ترین کانال شعاعی سمت چپ با حاشیه فلس، ۶- گوشه پایینی سمت راست فلس، ۷- گوشه پایینی سمت چپ فلس. (B) جایگاه ۲۳ لندمارک کاذب تعیین شده پیرامون فلس با نرم افزار MakeFan نسخه ۶.

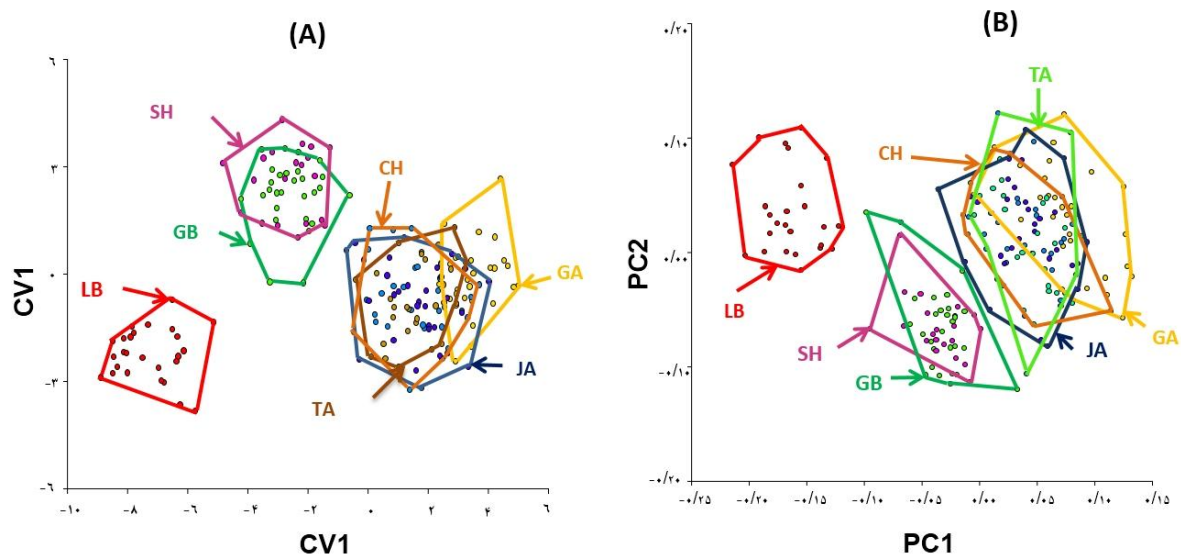
نتایج

در رودخانه های تجن، جاجرود، چشمه علی دامغان و قره چای بر اساس ۲۳ لندمارک معنی دار نبود ($P > 0/05$). در روش ریخت سنجی هندسی بر اساس ۷ لندمارک میان جمعیت ماهی خیاطه قره چای و سایر جمعیت های این گونه اختلاف معنی دار مشاهده شد ($P = 0/0021$).

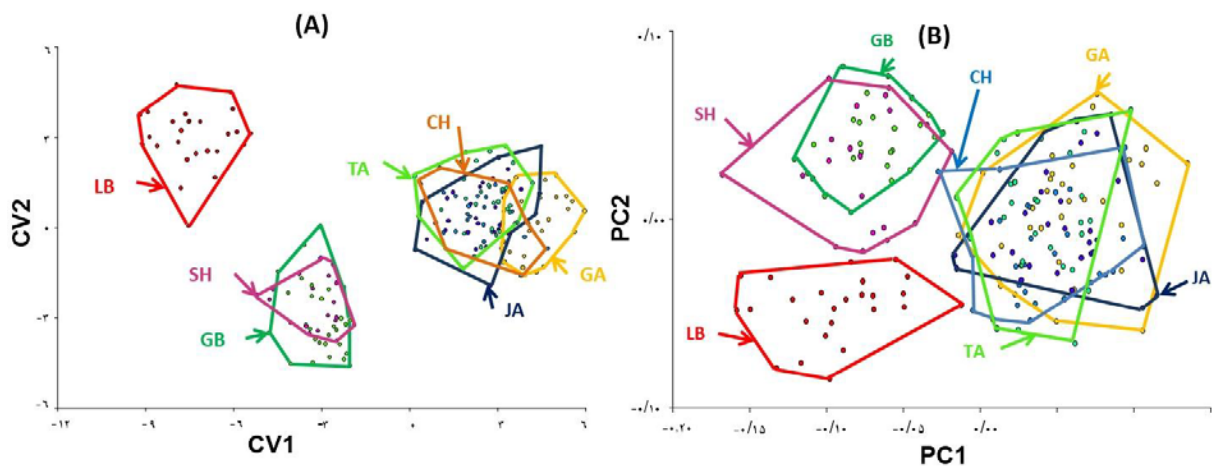
تفاوت شکل فلس های گونه های سس ماهی بزرگ سر، ماهی خیاطه و ماهی سفید در شکل های ۴ و ۵ نشان داده شده است. همان طور که در این شکل ها مشاهده می شود، فلس ماهی خیاطه نسبت به دو گونه دیگر در دو بخش جانبی پهن تر بوده، فاصله مرکز آن تا پایین ترین و بالاترین نقطه در راستای خط مرکز نیز کوتاه تر است. فلس های ماهی سفید نسبت به ماهی خیاطه در بخش نیمه فوقانی در دو طرف بالاترین نقطه فلس در راستای خط مرکز اندکی پهن است. فلس های ماهی سفید نسبت به سس ماهی بزرگ سر در دو جانب تحتانی عرض کمتری داشته، فاصله مرکز آن نیز تا نقطه زیرین در راستای خط مرکز کمتر است (شکل ۵).

تحلیل تجزیه به تابع های اصلی شکل فلس ها با استفاده از ۷ لندمارک، تغییرات شکل فلس را در سه مؤلفه اصلی ($PC1=44/66$ ، $PC2=22/46$ و $PC3=9/84$) با مجموع ۷۶/۷۷ درصد و با قرار دادن ۲۳ لندمارک کاذب تعیین شده پیرامون فلس، تغییرات شکل فلس را در سه مؤلفه اصلی ($PC1=50/16$ ، $PC2=13/79$ و $PC3=11/37$) با مجموع ۷۵/۳۲ درصد آشکار نمود (شکل های ۲-B و ۳-B). تحلیل PCA و CVA در هر دو روش ریخت سنجی هندسی سه ناحیه کاملاً مجزا بر اساس شکل فلس گونه ها را مشخص نمودند، به بیان دیگر ماهیان را بر اساس شکل فلس جدا نمود. تحلیل Manova تفاوت معنی داری را بین شکل فلس هر سه گونه (سس ماهی بزرگ سر، ماهی خیاطه و ماهی سفید) مورد مطالعه نشان داد ($P < 0/001$) (شکل های ۲-A و ۳-A).

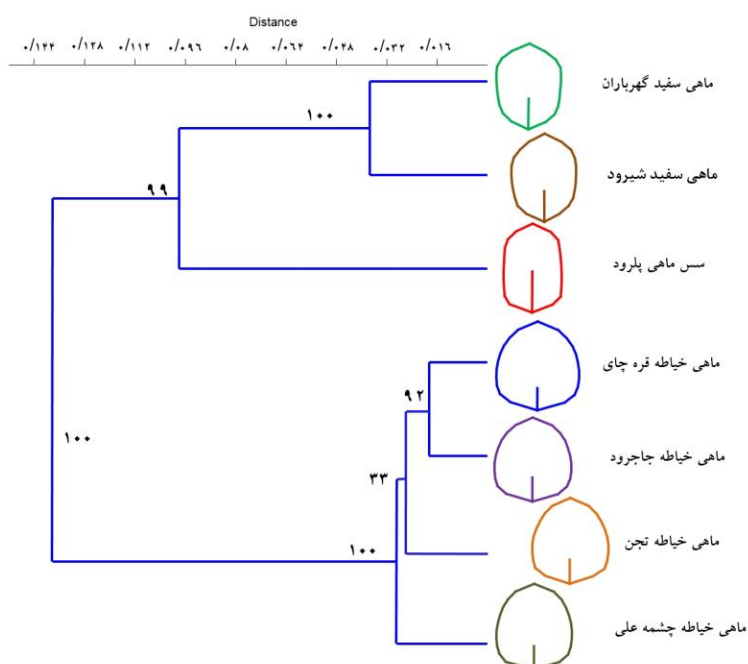
تفاوت های شکل فلس دو جمعیت ماهی سفید (*R. frisii kutum*) متعلق به رودخانه های شیروود و گهراران و جمعیت های ماهی خیاطه (*A. eichwaldi*)



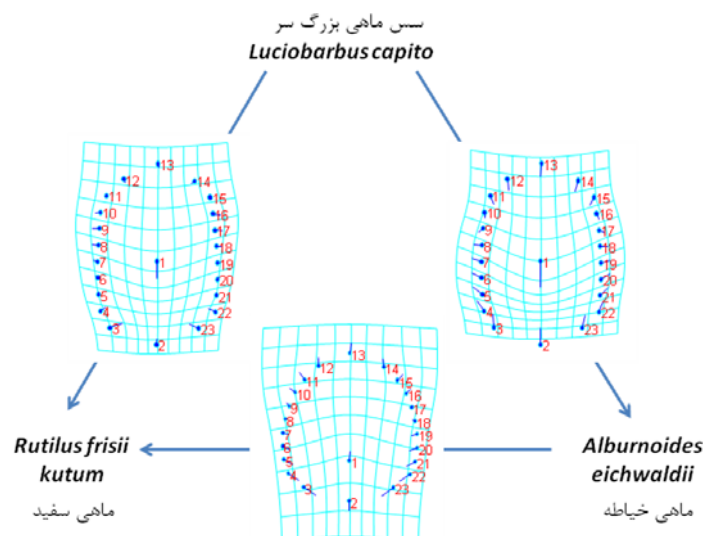
شکل ۲- (A) نمودار CVA، (B) نمودار PCA شکل فلس گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف کپورماهیان با استفاده از ۷ لندمارک. (LB=سس ماهی بزرگ سر، SH= ماهی سفید شیروود، GB= ماهی سفید گهرباران، CH= ماهی خیاطه چشمه‌علی، GA= ماهی خیاطه قره‌چای، JA= ماهی خیاطه جاجرود و TA= ماهی خیاطه تجن).



شکل ۳- (A) نمودار CVA، (B) نمودار PCA شکل فلس گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف کپورماهیان با استفاده از ۲۳ لندمارک. (LB=سس ماهی بزرگ سر، SH= ماهی سفید شیروود، GB= ماهی سفید گهرباران، CH= ماهی خیاطه چشمه‌علی، GA= ماهی خیاطه قره‌چای، JA= ماهی خیاطه جاجرود و TA= ماهی خیاطه تجن).



شکل ۴- نمودار تحلیل خوشه‌ای شکل فلس گونه‌ها و جمعیت‌های سه گونه کپورماهی مود مطالعه (اشکال ارایه شده بیان کننده میانگین شکل فلس هر جمعیت است) (اعداد مقابل شاخه‌ها بیانگر درصد تکرارهای حمایت کننده هر شاخه است).



شکل ۵- مقایسه شکل فلس سه گونه کپورماهی (شبکه‌های تغییر، تفاوت شکل فلس‌ها را به صورت تغییر از یک گونه به گونه دیگر نشان می‌دهد).

که تفاوت معنی‌داری میان اشکال فلس گونه‌های مطالعه شده وجود دارد. از آنجا که داشتن فلس دایره‌ای یک ویژگی مشترک اعضای این خانواده است، می‌توان بیان نمود که فلس هر گونه دارای الگوی شکلی منحصر به فردی است که می‌تواند به عنوان یک کلید شناسایی

بحث

مطالعه حاضر با هدف تعیین ارزش تشخیصی شکل فلس به عنوان روشی آسان و سریع در شناسایی چند گونه از کپورماهیان ایران با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی به اجرا درآمد و نتایج نشان داد

(Ibanez et al., 2007). محیط می‌تواند بر ریخت ماهیان تأثیرگذار باشد و به تفاوت‌های ریختی جمعیت‌های موجود در محیط‌های مختلف منجر گردد که بیان‌کننده اثرگذاری تفاوت‌های محیطی بر فنوتیپ است (Ibanez et al., 2007; Poulet et al., 2005).

علیرغم جدایی آلوپاتریک جمعیت‌های ماهی خیاطه در رودخانه تجن، جاجرود و چشمه علی دامغان، احتمالاً تفاوت در شرایط هیدرودینامیکی محیطی جمعیت‌های ماهی خیاطه به حدی نبوده است که سبب تفاوت‌های فنوتیپی بارز در آنها گردد. احتمال دارد تشابه شکل فلس‌های ماهی سفید نیز جدا نشدن جمعیت‌ها به دلیل عدم مهاجرت تولید مثلی ماهیان به رودخانه نوزادگاهی (Schtickzelle and Quinn, 2007) و نیز تأثیر بازسازی ذخایر آن در اختلاط جمعیت‌ها باشد.

نتایج به کارگیری روش ریخت‌سنجی هندسی بر مبنای نقاط هم‌ساخت (با ۷ لندمارک) و روش محیط پیرامونی (با ۲۳ لندمارک کاذب)، کاملاً با یکدیگر منطبق بودند. از این رو، نتایج نشان داد که تعداد اندک لندمارک نیز می‌تواند به خوبی اختلافات میان شکل فلس‌ها را ظاهر نماید و صحت، سرعت و دقت روش شناسایی شکل فلس بر اساس لندمارک‌گذاری را تأیید نمود. بنابراین، شناسایی گونه‌ها بر اساس شکل فلس به عنوان روشی سریع و کم‌هزینه نسبت به روش‌های ژنتیکی امکان بررسی افراد بیشتر و شناسایی تنوع‌های موجود را امکان‌پذیر می‌نماید (Ibanez et al., 2007). همچنین، بر اساس مقایسه نتایج این پژوهش و مطالعات قبلی، می‌توان بیان داشت که تأیید تفاوت شکل فلس جمعیت‌های مختلف یک گونه، در مورد جمعیت‌های سایر گونه‌ها نمی‌تواند صادق باشد.

برای آن گونه در نظر گرفته شود. نتایج مطالعه Ibanez و همکاران (۲۰۰۷) نیز بر روی تفاوت‌های شکلی فلس‌های شانه‌ای کفال‌ماهیان جهت شناسایی جنس، گونه و ذخایر آنها بر اساس روش ریخت‌سنجی هندسی نشان داد که بیشترین تمایز شکل فلس‌ها میان جنس‌ها و گونه‌ها وجود دارد و تفاوت شکل فلس در میان جنس‌ها و گونه‌ها شاهدهی بر زمینه ژنتیکی آن است.

نتایج تحقیق حاضر همچنین نشان داد که تفاوت شکل فلس جمعیت‌های مختلف گونه‌های ماهیان خیاطه و سفید معنی‌دار نیست. Ibanez و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان دادند که در جمعیت‌های مختلف یک گونه از کفال‌ماهیان، شکل فلس وابسته به فاصله جغرافیایی است. Poulet و همکاران (۲۰۰۵) نیز در بررسی شکل فلس سه جمعیت از زیر گونه *Leuciscus leuciscus burdigalensis* رودخانه Viaur فرانسه با استفاده از روش خط سیر پیرامونی دریافتند که میزان تفاوت شکل فلس میان جمعیت‌های مختلف وابسته به فاصله بوده و نشان‌دهنده تفاوت عوامل محیطی نواحی بالادست و پایین دست رودخانه است. در مطالعه فوق با توجه به وجود انشعابات متعدد در رودخانه و تفاوت در جایگاه تخم‌ریزی جمعیت‌های مختلف *L. burdigalensis*، امکان جدا بودن ژنتیکی این جمعیت‌ها و در نتیجه احتمال تأثیر شرایط محیطی و زمینه ژنتیکی متفاوت بر شکل فلس وجود دارد (Poulet et al., 2005).

تفاوت در شکل فلس علاوه بر وابسته بودن به گونه ماهی، ممکن است ناشی از سازگاری به شرایط محیطی به ویژه شرایط متفاوت هیدرودینامیکی نیز باشد که در پژوهش‌هایی با دیدگاه شکل-عملکرد (shape-function) قابل تشخیص است (Ibanez et

منابع

- Cardin, S. X. (2000) Advances in morphometric identification of fishery stocks. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 91-112.
- Chen, W. J. and Mayden, R. L. (2009) Molecular systematics of the Cyprinoidea (Teleostei: Cypriniformes), the world's largest clade of freshwater fishes: Further evidence from six nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 544-549
- Chen, X. M., Milne, N. and O'Higgins, P. (2005) Morphological Variation of the thoracolumbar vertebrae in Macropodidae and its functional relevance. *Journal of Morphology* 266: 167-181.
- Coad, B. (2012) Freshwater fishes of Iran. Retrieved from <http://www.briancoad.com>. On: 30 April 2013.
- Crews, S. C. and Hedin, M. (2006) Studies of morphological and molecular phylogenetics in spiders (Araneae: Homalonychus) from the American southwest, including divergence along the Baja California Peninsula. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 38: 470-487.
- Ibanez, A. L., Cowx, I. G. and O'Higgins, P. (2007) Geometric morphometric analysis of fish scales for identifying genera, species and local populations within the Mugilidae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 64: 1091-1100.
- Ihsen, P. E., Brooke, H. E., Casselman, J. M., McGlade, J. M., Payne, N. R. and Utter, F. M. (1981) Stock identification: materials and methods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquacultural Science* 38: 1838-1855.
- Klingenberg, C. P. (2011) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11: 353-357.
- Murta, A. G. (2000) Morphological variation of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Iberian and North African Atlantic: implication for stock identification. *ICES Journal of Marine Science* 57: 1240-1248.
- Nelson, J. S. (2006) *Fishes of the world*. John Wiley & Sons, Inc., London.
- Poulet, N., Reyjol, Y., Collier, H. and Lek, S. (2005) Does fish scale morphology allow the identification of populations at a local scale? A case study for rostrum dace *Leuciscus leuciscus burdigalensis* in River Viaur (SW France). *Aquatic Sciences* 67: 122-127.
- Recasens, L., Lombarte, A. and Sanchez, P. (2006) Teleostean fish assemblages in artificial reef and a natural rocky area in Catalonia (northwestern Mediterranean): an ecomorphological approach. *Bulletin of Marine Science* 78: 71-82.
- Rohlf, F. J. (2004) tpsSpline, thin-plate spline, version 1.20. US Patents DEB 93-17572, IBN-0090445 and DEB-0212023.
- Rohlf, F. J. (2005) tpsDig2, digitize landmarks and outlines, version 2.05. US Patent DEB 93-17572.
- Schtickzelle, N. and Quinn, T. P. (2007) A metapopulation perspective for salmon and other anadromous fish. *Fish and Fisheries* 8: 297-314.
- Swain, D. P. and Foote, C. J. (1999) Stocks and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification. *Fisheries Research* 43: 113-128.
- Watkinson, D. A. and Gillis, D. M. (2005) Stock discrimination of Lake Winnipeg walleye based on Fourier and wavelet description of scale outline signals. *Fisheries Research* 72: 193-203.
- Zelditch, M. (2004) *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Elsevier Academic Press, New York.

ساختار ژنتیکی شاه کولی جنوبی (*Alburnus mossulensis* Heckel, 1843) با استفاده از نشانگر ریزماهوره، در حوضه دجله

زهرا شفیعی^۱، سالار درافشان^{۱*}، یزدان کیوانی^۱ و سید احمد قاسمی^۲
^۱ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
^۲ مرکز پژوهش‌های خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

چکیده

ساختار ژنتیکی پنج جمعیت از شاه کولی جنوبی (*Alburnus mossulensis* Heckel, 1843) با استفاده از چهار جایگاه ریزماهوره (BL1-2b، BL1-98، CypG24 و Rser10) در حوضه دجله شامل جمعیت‌های رودخانه کنجان‌چم، کشگان، دورود و دویلان و داوودعرب (هر کدام ۳۰ قطعه، به جز رودخانه داوودعرب ۲۵ قطعه) مطالعه شد. در مجموع، آغازگرها به ازای هر مکان ژنی ۴۳ آلل، با میانگین ۱۰/۷۵ تکثیر کردند. محدوده آللی برای CypG24، BL1-2b، BL1-98 و Rser10 به ترتیب: ۱۳۸-۲۱۵، ۱۴۱-۱۸۰، ۲۷۲-۳۰۰ و ۱۷۶-۲۴۰ جفت باز بود. هتروزیگوسیتی مورد انتظار از ۰/۷۹ (داوودعرب) تا ۰/۸۴ (کنجان‌چم و کشگان) با میانگین ۰/۸۲۵ و هتروزیگوسیتی مشاهده شده از ۰/۶۹ در جمعیت کنجان‌چم تا ۰/۸۱ در جمعیت کشگان با میانگین ۰/۷۵ متغیر بود. انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ در جایگاه‌های BL1-98، BL1-2b و CypG24 در تمامی جمعیت‌ها و جایگاه Rser10 در جمعیت داوودعرب معنی‌دار بود ($P < 0.001$). میانگین F_{ST} در بین جمعیت‌های مطالعه شده برابر با ۰/۰۲ و بین سه حوضه برابر با ۰/۰۷۱ بود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی بیانگر وجود حدود ۱۷/۶ درصد از تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌ها و ۸۲/۴ درصد درون جمعیت‌ها بود. میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها به ترتیب: در دامنه: ۰/۶۹۶-۰/۸۹۴ و ۰/۱۱۱-۰/۳۴ قرار داشت. تمایز ژنتیکی اندک اما معنی‌داری بین جمعیت‌ها مشاهده شد ($P < 0.05$). برای درک بهتر ساختار جمعیتی شاه کولی جنوبی مطالعه ساختار ژنتیکی آن با استفاده از تعداد بیشتری نشانگر ریزماهوره توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: شاه کولی جنوبی، *Alburnus mossulensis*، ریزماهوره، تنوع ژنتیکی، تفاوت ژنتیکی

مقدمه

کپورماهیان (Cyprinidae)، سگ‌ماهیان جویباری (Balitoridae) و رفتگرماهیان (Cobitidae) هستند که اغلب ارزش صید اقتصادی، صید ورزشی، زیبایی‌شناسی، مبارزه زیستی و حفاظتی دارند (Abdoli

ماهی‌های آب‌های شیرین ایران، بسیار متنوع و جالب توجه هستند. حدود ۱۴۰ گونه ماهی در آب‌های داخلی ایران وجود دارد که اغلب آنها از سه خانواده

جمعیت، برای ارزیابی اثر عوامل مختلف روی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت مفید است (Okumus and Ciftci, 2003). چندین نوع نشانگر در مطالعات مرتبط به آبریان رایج است که در این بین ریزماهورها (microsatellite) از کاربرد و اهمیت خاصی برخوردار هستند. این نشانگرهای مولکولی، شکلی از توالی‌های تکراری DNA هستند که از نظر سرعت، دقت، سهولت کار، ماهیت وراثت هم‌بارزی، سطح بالای چندشکلی، فراوانی آللی بالا و فراوانی زیاد در ژنوم موجودات به منظور شناسایی ارقام و ژنوتیپ‌ها، مطالعات ژنتیک جمعیت و مطالعات فیلوژنی بی‌نظیر هستند (Reddy et al., 2002).

چندین علت برای حفظ پایداری جمعیت‌ها وجود دارد. جوامع ماهیان وحشی از ارزش ذاتی برخوردارند و دارای نقش‌های بوم‌شناسی مهم در ساختار و عملکرد جوامع آبرزی به لحاظ ارزش اقتصادی و زیبایی‌شناختی داشته، فراتر از آن، حفظ پایداری جوامع آنها لازم است. تاکنون، مطالعات اندکی در مورد شاه کولی جنوبی منتشر شده است که در هیچ یک از آنها به بررسی ساختار ژنتیکی آن پرداخته نشده است (Ergene, 1993; Mousavi, 2011). مطالعه حاضر با توجه به اهمیت شاه کولی جنوبی به عنوان گونه‌ای بومی در ایران که دارای گستره پراکنش وسیع و شایان توجهی در اکوسیستم‌های آبی است، و به منظور درک ساختار تنوع ژنتیکی آن در حوضه دجله طراحی و اجرا شد.

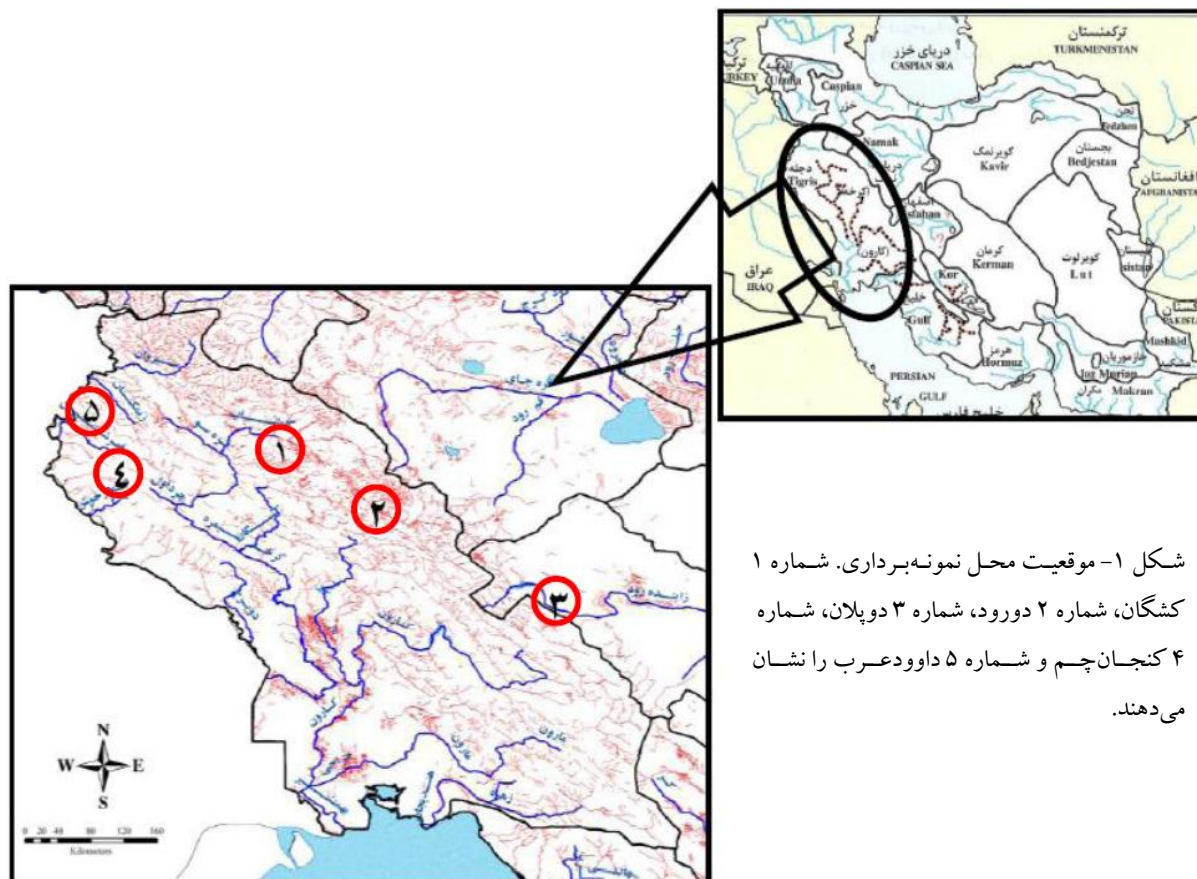
مواد و روش‌ها

نمونه برداری از سه حوضه آبریز دجله یعنی کارون، کرخه و سرشاخه‌های دیاله در رودخانه‌های کنجان‌چم، کشگان، دورود و دوپلان و داوودعرب

(2000. شاه کولی جنوبی *Alburnus mossulensis*) Heckel, 1843 متعلق به راسته کپورماهی‌شکلان (Cypriniformes)، خانواده کپورماهی‌سانان (Cyprinidae)، زیرخانواده عروس‌ماهی‌سانان (Leuciscinae) و جنس *Alburnus* است. این جنس در جهان دارای ۳۹ گونه ثبت شده است که ۷ گونه از آن در آب‌های ایران زیست می‌کند. پراکنش این ماهی در حوضه دجله و فرات و نیز آب‌های داخلی ایران در حوضه‌های اصفهان، بوشهر، دجله و فارس گزارش شده است (Abdoli, 2000). هر فرد به عنوان یک خزانه ژنی محسوب می‌شود و جمعیت‌ها مجموعه متنوعی از ژن‌ها هستند که عواملی نظیر: آلودگی، صید بی‌رویه، شرایط نامناسب آب و هوایی و از بین رفتن زیستگاه‌ها به کاهش اندازه مؤثر جمعیت‌ها و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی ذخایر منجر می‌شود. شاه کولی جنوبی به لحاظ ذخیره ژنتیکی در ایران بسیار حایز اهمیت است. تنوع ژنتیکی، کلید پایداری طولانی مدت جمعیت‌ها است (Beaumont and Hoare, 2003). اعمال مدیریتی صحیح بر ذخایر آبریان زمانی با موفقیت همراه خواهد بود که ذخایر ژنی گونه‌های بومی مطالعه شده باشند. از آن جا که فراوانی یک جمعیت به دلیل تغییراتی که در احتمال بقا و موفقیت تولید مثلی رخ می‌دهد، تغییر می‌کند، یک حوضه آبریز ممکن است دارای چندین جمعیت از یک گونه باشد، بنابراین نخستین گام در این زمینه، تشخیص صحیح گونه‌ها، جمعیت‌ها و نژادها است که این امر هم از نظر مدیریت شیلات و هم حفاظت از گونه‌ها دارای اهمیت است. برای شناسایی جمعیت‌های مختلف از یک گونه روش‌های متفاوتی وجود دارد که یکی از آنها استفاده از نشانگرهای مولکولی است. نشانگرهای مولکولی در مطالعه ژنتیک

DNA استخراجی با روش الکتروفورز با ژل آگاروز ۱ درصد تعیین شد. به علت عدم وجود آغازگر اختصاصی برای شاه کولی جنوبی، در این پژوهش از چهار جفت آغازگر ریزماهواره چندشکل طراحی شده برای دو گونه *Alburnus alburnus* و *Alburnoides bipunctatus* (متعلق به زیرخانواده *Leuciscinae*) استفاده شد (جدول ۲).

انجام شد (جدول ۱، شکل ۱). از هر ایستگاه (به جز رودخانه داوودعرب ۲۵ قطعه)، تعداد ۳۰ قطعه ماهی شاه کولی جنوبی در تابستان ۱۳۸۸ صید و پس از نمونه گیری از بافت نرم باله دمی در الکل اتانول ۹۶ درصد تثبیت شدند. برای استخراج DNA، از کیت استخراج DNA ساخت شرکت TAKARA ژاپن مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. کیفیت



جدول ۱- محل و موقعیت جغرافیایی جمع آوری ماهی شاه کولی جنوبی

تعداد نمونه	مختصات جغرافیایی	رودخانه	حوضه آبریز	استان
۳۰	۴۶°۱۵'۱۳" E ۳۳°۱۷'۳۵" N	کنجان چم	دیاله	ایلام
۳۰	۵۰°۳۶'۱۱" E ۳۱°۵۴'۵۹" N	دوپلان	کارون	چهارمحال و بختیاری
۲۵	۴۵°۴۸'۱۸" E ۳۴°۱۶'۱۳" N	داوودعرب	دیاله	کرمانشاه
۳۰	۴۸°۴۶'۱۷" E ۳۳°۳۱'۱۱" N	دورود	کارون	لرستان
۳۰	۴۷°۵۷'۴۹" E ۳۳°۲۲'۳۱" N	کشگان	کرخه	لرستان

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای استفاده شده در پژوهش حاضر (Dubut *et al.*, 2009a; 2009b)

اندازه باندها	توالی آغازگر (3'→5')	موتیف	کد دسترسی در بانک جهانی ژن	جایگاه ژنی
143-179	F:TTTGCCTAGTAACGAGCATCA R:CAGCACAGTTTCTCCATCCA	(TG) ₁₂	FJ468347	BL1-2b
271-296	F:ATTGTTTTTCATTTTGTGTCAG R:CCGAGTGTGTCAGAGTTATT	(CA) ₉ CTAA(CA) ₃ N ₅₀ (CA) ₄	FJ468349	BL1-98
193-222	F:TGCGTAATCGTGAAGCGGTG R:GCCACTAAAGCGCAGAAGCC	(GT) ₁₂	AJ312850	Rser10
140-272	F:CTGCCGCATCAGAGATAAACACTT R:TGGCGGTAAGGGTAGACCAC	(CAGA) ₁₉	AY439142	CypG24

(Rousset, 1995) محاسبه شد. انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ و آزمون معنی دار بودن با محاسبه مقادیر P با روش مربع کای و با نرم افزار PopGene نسخه ۳/۲ انجام شد (Raymond and Rousset, 1995). همچنین، تعداد افراد مهاجر (Nm) و ضریب درون آمیزی (F_{IS}) برای همه جمعیت ها در هر جایگاه ژنی با نرم افزار PopGene نسخه ۳/۲ محاسبه شد (Raymond and Rousset, 1995). آنالیز واریانس مولکولی روی پنج جمعیت و سه حوضه دجله، کارون و کرخه با نرم افزار ARLEQUIN نسخه ۳/۱ انجام شد (Schneider *et al.*, 2000). تخمین مقادیر دو به دو F_{ST} و آزمون معنی دار بودن با محاسبه مقادیر P برای انجام تفکیک ژنتیکی بین جمعیت ها و حوضه ها با نرم افزار ARLEQUIN نسخه ۳/۱ انجام شد (Schneider *et al.*, 2000). ضریب خویشاوندی F_{IS} برای پنج جمعیت با نرم افزار GenAlex نسخه ۶ ارزیابی شد (Peakall and Smouse, 2005). روابط ژنتیکی بین پنج جمعیت با فاصله ژنتیکی Nei (۱۹۷۲) با نرم افزار PowerMarker نسخه ۳/۰ آزموده شد (Liu and Muse, 2004) and دندروگرام با روش Neighbor Joining (اتصال همجواری) بر اساس Nei (۱۹۷۲)

تکثیر جایگاهها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتری و شرایطی شامل ۱ میکرولیتر DNA (۱۰ ng/μL)، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ pM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ mM)، ۰/۲ میکرولیتر Taq polymerase ساخت شرکت سیناژن (۵۰ μL)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR X، ۱۰، ۰/۷ میکرولیتر MgCl₂ (۵۰ میلی مولار) و آب مقطر تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. شرایط PCR شامل یک سیکل در دمای ۹۴°C به مدت سه دقیقه، ۳۵ سیکل در دمای ۹۴°C به مدت یک دقیقه، در دمای ۵۶°C به مدت ۳۰ ثانیه، سپس، در دمای ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و در پایان، یک چرخه در دمای ۷۲°C به مدت پنج دقیقه اجرا شد. محصول واکنش در دمای ۴°C نگهداری و برای آشکارسازی از ژل پلی اکرلامید ۱۲ درصد همراه با رنگ آمیزی نترات نقره و نشانگر ۵۰bp ساخت شرکت Fermentas استفاده شد.

شاخص‌های تنوع ژنتیکی مانند تعداد آلل مؤثر، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، هتروزیگوسیتی مشاهده شده، محتوای اطلاعات چندشکل و شاخص شانون با نرم افزار PowerMarker نسخه ۳/۰ (Liu and Muse, 2004) و PopGene نسخه ۳/۲ (Raymond and

آلل مشاهده شده و مؤثر در چهار جایگاه ژنی CypG24، BL1-2b، BL1-98 و Rser10 به ترتیب: ۱۱، ۸/۴، ۵/۸ و ۱۰/۲ با میانگین ۸/۸۵ و ۸/۱۲، ۵/۶۹ و ۴/۹۲ و ۷/۰۹ با میانگین ۶/۴۶ بود. میزان محتوای اطلاعات چندشکلی در چهار جایگاه ژنی CypG24 مطالعه شده به ترتیب: ۰/۸۹، ۰/۸۲۵، ۰/۷۵، ۰/۸۸ با میانگین ۰/۸۳۵ به ازای هر جمعیت محاسبه شد (جدول ۴).

جدول ۳- جایگاه‌های بررسی شده و آلل‌های یافت شده در پنج جمعیت شاه کولی جنوبی. آلل‌ها بر اساس اندازه هستند. آلل‌ها بر اساس اندازه هستند. برای هر ایستگاه حروف اختصاری تعریف شده است. P: ایستگاه دوپلان، K: ایستگاه کشگان، D: ایستگاه داوودعرب، O: ایستگاه دورود و N: ایستگاه کنجان‌چم.

جایگاه ژنی

CypG24	BL1-2b	BL1-98	Rser10
۱۳۸ ^P	۱۴۱ ^{PDON}	۲۷۲ ^{ON}	۱۷۶ ^K
۱۴۷ ^{DN}	۱۴۵ ^{PKDON}	۲۷۷ ^{PKDON}	۱۸۴ ^{KON}
۱۵۳ ^{PKDON}	۱۵۰ ^{PKDON}	۲۷۹ ^{PKDON}	۱۸۸ ^{KDON}
۱۵۸ ^{PKDON}	۱۵۶ ^{PKDON}	۲۸۴ ^{PKDON}	۱۹۲ ^{PKDON}
۱۶۲ ^{PKDON}	۱۶۰ ^{PKDON}	۲۸۶ ^{PKN}	۱۹۶ ^{PKDON}
۱۶۸ ^{PKDN}	۱۶۷ ^{PKDON}	۲۹۰ ^{PKON}	۲۰۰ ^{PKDON}
۱۷۱ ^{PKDON}	۱۷۱ ^{PKDON}	۲۹۵ ^{PKON}	۲۰۶ ^{PKDON}
۱۷۶ ^{PKDON}	۱۷۵ ^{PKDON}	۳۰۰ ^N	۲۱۲ ^{PKDON}
۱۸۳ ^{PKDON}	۱۸۰ ^{KDO}		۲۲۵ ^{PKDON}
۱۸۷ ^{PKDON}			۲۳۱ ^{PKDON}
۱۹۳ ^{PKDON}			۲۳۶ ^{PKDON}
۲۰۰ ^{PKDON}			۲۴۰ ^{PON}
۲۰۴ ^N			
۲۱۰ ^K			

در میان پنج جمعیت، میانگین تعداد آلل مشاهده شده از ۸/۲۵ آلل در جمعیت داوودعرب تا ۹/۷۵ آلل در جمعیت کنجان‌چم با میانگین ۸/۸۵ آلل به ازای هر جایگاه ژنی و تعداد آلل مؤثر از ۵/۳۳ در جمعیت دوپلان تا ۶/۸۴ آلل در جمعیت کشگان با میانگین ۶/۴۶ آلل به ازای هر جایگاه ژنی متغیر بود.

ترسیم شد و آزمون بوت استرپ به منظور به دست آوردن نمودار خوشه‌ای مورد توافق انجام شد. در پایان، دندروگرام با نرم‌افزار MEGA نسخه ۴ رسم شد (Rohlf, 2000).

نتایج

تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها

نتایج به دست آمده از الگوی بانندی حاصل از تکثیر چهار جفت آغازگر ریزماهوره BL1-98، BL1-2b، CypG24 و Rser10 در پنج جمعیت مورد مطالعه در جدول ۳ ارایه شده است. تعداد آلل مشاهده شده بسیار متفاوت و از ۸ آلل (BL1-98) تا ۱۴ آلل (CypG24) متغیر بود. در مجموع، ۴۳ آلل، با میانگین ۱۰/۷۵ به ازای هر مکان ژنی تکثیر شد. محدوده آللی برای نشانگر CypG24 بین ۱۳۸-۲۱۵ جفت باز، برای نشانگر BL1-2b بین ۱۴۱-۱۸۰ جفت باز، برای نشانگر BL1-98 بین ۲۷۲-۳۰۰ جفت باز و برای نشانگر Rser10 بین ۱۷۶-۲۴۰ جفت باز بود. نرم‌افزار ARLEQUIN نسخه ۳/۱ این چهار نشانگر را ۱۰۰ درصد چندشکل معرفی کرد.

همپوشانی قابل ملاحظه‌ای در آلل‌های موجود بین جمعیت‌ها در هر جایگاه ژنی مشاهده شد. سه جایگاه CypG24، BL1-98 و Rser10 آلل‌های منحصر به فردی را در حداقل یک جمعیت نشان دادند. حضور آلل‌های منحصر به فرد در این سه جایگاه ژنی نشان از تفاوت بین جمعیت‌ها است که هر کدام بخشی از تنوع ژنتیکی کل را نشان می‌دهند (جدول ۳).

هتروزیگوسیتی مورد انتظار در چهار جایگاه ژنی CypG24، BL1-2b، BL1-98 و Rser10 به ترتیب: ۰/۸۹۸، ۰/۸۴۲، ۰/۷۷۹ و ۰/۸۸۸ با میانگین ۰/۸۵۲ و ۰/۹۴، ۰/۹۹۹ و ۰/۹۵ با میانگین ۰/۷۵ برآورد شد. تعداد

بیان دیگر، جمعیت‌ها از نظر تنوع ژنتیکی شبیه یکدیگر هستند. آزمون تعادل هاردی-وینبرگ برای تمام جایگاه‌های ژنی در تمام جمعیت‌ها نشان داد که نشانگرهای BL1-98، BL1-2b و CypG24 در تمام جمعیت‌ها و نشانگر Rser10 در جمعیت داوودعرب به طور معنی‌داری از تعادل انحراف داشتند ($P < 0.001$)، جدول ۵). در پنج جمعیت کشکان، دورود، کنجان‌چم، دوپلان و داوودعرب مقادیر آماره F_{IS} به ترتیب: ۰/۱۹۲، ۰/۴۹۱، ۰/۷۶۱، ۰/۳۹۴ و ۰/۵۸۱ محاسبه شد (جدول ۴).

هتروزیگوسیتی مورد انتظار از ۰/۷۹ (داوودعرب) تا ۰/۸۴ (کنجان‌چم، کشکان) با میانگین ۰/۸۲۵ و هتروزیگوسیتی مشاهده شده از ۰/۶۹ در جمعیت کنجان‌چم تا ۰/۸۱ در جمعیت کشکان با میانگین ۰/۷۵ متغیر بود (جدول ۴). میانگین جریان ژنی بین جمعیت‌های شاه‌کولی جنوبی برابر با ۷/۱۱ بود (جدول ۴). در مطالعه چهار جایگاه ژنی، مقادیر هتروزیگوسیتی مورد انتظار یا تنوع ژنتیکی در پنج جمعیت شایان توجه است، اما مقایسه آنها نشان داد که این جایگاه‌ها تفاوت معنی‌داری بین جمعیت‌ها ایجاد نکردند ($P > 0.01$). به

جدول ۴- تنوع و روابط ژنتیکی چهار جایگاه چندشکل ریزماهواره در پنج جمعیت شاه‌کولی جنوبی

جایگاه ژنی	شاخص‌های اندازه‌گیری شده	CypG24	BL1-2b	BL1-98	Rser10	میانگین	ضریب خویشاوندی
کشکان	تعداد آلل مشاهده شده	۱۱	۸	۶	۱۱	۹	
	تعداد آلل مؤثر	۹/۶۱	۵/۲۸	۴/۴۰	۸/۰۷	۶/۸۴	
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۹۳	۱/۰۰	۰/۳۰	۱/۰۰	۰/۸۱	-۰/۰۳۳±۰/۲۴۸
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (تنوع ژنی)	۰/۸۹	۰/۸۱	۰/۷۷	۰/۸۸	۰/۸۴	
	ضریب درون‌آمیزی	-۰/۰۴۴	-۰/۲۳۴	۰/۶۱۱	-۰/۱۴۱	۰/۱۹۲	
شاخص شانون	۲/۳۳	۱/۸۲	۱/۶۳	۲/۱۸	۱/۹۹		
تعداد آلل مشاهده شده	۹	۹	۶	۱۱	۸/۷۵		
دورود	تعداد آلل مؤثر	۷/۴۵	۵/۸۸	۴/۳۴	۸/۰۴	۶/۴۳	
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۹۷	۱/۰۰	۰/۰۳۲	۱/۰۰	۰/۷۵	-۰/۰۳۳±۰/۲۷۶
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (تنوع ژنی)	۰/۸۶	۰/۸۳	۰/۷۶	۰/۸۷	۰/۸۳	
	ضریب درون‌آمیزی	-۰/۱۱۸	-۰/۲۰۵	۰/۹۵۶	-۰/۱۴۲	۰/۴۹۱	
	شاخص شانون	۲/۰۹	۱/۹۲	۱/۶۱	۲/۲۰	۱/۹۵	
تعداد آلل مشاهده شده	۱۲	۸	۸	۱۱	۹/۷۵		
کنجان‌چم	تعداد آلل مؤثر	۷/۵۹	۵/۷۹	۴/۹۹	۷/۶۷	۶/۵۱	
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۹۷	۱/۰۰	۰/۰۳	۰/۷۶	۰/۶۹	-۰/۰۳۶±۰/۲۶۱
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (تنوع ژنی)	۰/۸۷	۰/۸۳	۰/۸	۰/۸۷	۰/۸۴	
	ضریب درون‌آمیزی	-۰/۱۱۳	-۰/۲۰۹	۰/۹۵۷	۰/۱۲۶	۰/۷۶۱	
	شاخص شانون	۲/۲۲	۱/۸۷	۱/۷۸	۲/۱۶	۲/۰۱	
تعداد آلل مشاهده شده	۱۱	۸	۶	۹	۸/۵		
دوپلان	تعداد آلل مؤثر	۷/۱۱	۵/۷۰	۳/۲۷	۵/۲۴	۵/۳۳	
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۸۷	۱/۰۰	۰/۱	۱/۰۰	۰/۷۴	-۰/۰۳۷±۰/۳۱۵
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (تنوع ژنی)	۰/۸۶	۰/۸۲	۰/۶۹	۰/۸۱	۰/۸۰	
	ضریب درون‌آمیزی	-۰/۰۰۸	-۰/۲۱۳	۰/۸۵۱	-۰/۲۳۶	۰/۳۹۴	
	شاخص شانون	۲/۰۹	۱/۹۰	۱/۳۹	۱/۸۲	۱/۸۰	

ادامه جدول ۴- ...

ضرب خویشاوندی	میانگین	Rser10	BL1-98	BL1-2b	CypG24	شاخص های اندازه گیری شده	جایگاه ژنی
	۸/۲۵	۹	۳	۹	۱۲	تعداد آلل مشاهده شده	
	۵/۹۵	۶/۴۵	۲/۶۹	۵/۷۹	۸/۸۶	تعداد مؤثر آلل	
-۰/۰۳۷±۰/۳۳	۰/۷۳	۰/۹۵	۰/۰۰	۱/۰۰	۰/۹۶	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	داوودعرب
	۰/۷۹	۰/۸۴	۰/۶۳	۰/۸۳	۰/۸۹	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (تنوع ژنی)	
	۰/۵۸۱	-۰/۱۳۰	۱/۰۰	-۰/۲۰۹	-۰/۰۸۰	ضرب درون آمیزی	
	۱/۸۲	۲/۰۰	۱/۰۴	۱/۹۲	۰/۳۱	شاخص شانون	
	۰/۸۳۵	۰/۸۸	۰/۷۵	۰/۸۲۵	۰/۸۹	میانگین محتوای اطلاعات چندشکل	
	۸/۸۵	۱۰/۲	۵/۸	۸/۴	۱۱	میانگین تعداد آلل برای هر جایگاه ژنی	
	۶/۴۶	۷/۰۹	۴/۹۲	۵/۶۹	۸/۱۲۴	میانگین تعداد آلل مؤثر برای هر جایگاه ژنی	
۰/۸۵۲±۰/۰۵	۰/۸۸۸	۰/۷۷۹	۰/۸۴۴	۰/۸۹۸	۰/۸۹۸	میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار	
۰/۷۵±۰/۴۳	۰/۹۵	۰/۰۹۹	۱/۰۰	۰/۹۴	۰/۹۴	میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده	
۰/۰۹۶	-۰/۱۰۳	۰/۸۷۲	-۰/۲۱۴	-۰/۰۷۳	-۰/۰۷۳	میانگین ضرب درون آمیزی (F _{IS})	
۷/۱۱	۶/۷۶	۴/۴۴	۱۰/۳۲	۹/۶۳	۹/۶۳	میانگین جریان ژنی	
۲/۱±۰/۳۱	۲/۲۹	۱/۷۰	۱/۹۹	۲/۴	۲/۴	میانگین شاخص شانون	

جدول ۵- انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ برای چهار جایگاه ریزماهوره در پنج جمعیت شاه کولی جنوبی. n.s.: جایگاه هایی که در تعادل هاردی-وینبرگ قرار دارند ($P > 0.001$) و بقیه انحراف از تعادل را نشان می دهند ($P < 0.001$). a: در جایگاه های منحرف نشان از افزایش هتروزیگوسیتی و b: نشان از کاهش هتروزیگوسیتی دارد.

Rser10	BL1-98	BL1-2b	CypG24	جمعیت / جایگاه ژنی
n.s.	b	a	a	کشگان
n.s.	b	a	a	دورود
n.s.	b	a	a	کنجان چم
n.s.	b	a	a	دوپلان
a	b	a	a	داوودعرب

روابط و تفاوت ژنتیکی بین جمعیت ها

ارزیابی تفاوت ژنتیکی بین جمعیت ها با کمک مقادیر F_{ST} بین دو به دو جمعیت ها نشان داد که تفاوت معنی داری بین هفت جفت از جمعیت ها (دو جفت در سطح احتمال ۰/۰۰۱، چهار جفت در سطح احتمال ۰/۰۵ و یک جفت در سطح احتمال ۰/۰۱) وجود دارد (جدول ۶). مقادیر عددی این شاخص بین دو به دو جمعیت ها از ۰/۰۱۵ (بین کشگان و داوودعرب) تا ۰/۰۴۵ (بین دورود و دوپلان) متغیر بود. با وجود این

که تفاوت معنی داری در تنوع ژنتیکی بین پنج جمعیت مشاهده نشد، اما تفاوت ژنتیکی بین جمعیت ها با میزان ۰/۰۲ معنی دار بود ($P < 0.05$).

تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۱۷/۶ درصد تنوع مربوط به بین جمعیت ها و ۸۲/۴ درصد مربوط به درون جمعیت ها است. به بیان دیگر، بیشتر تنوع به تفاوت در درون افراد تعلق دارد و فقط سهم کوچکی از تنوع به تفاوت بین جمعیت ها اختصاص دارد. مقادیر P بیانگر آن است که اختلاف بین جمعیت ها در سطح

فاصله ژنتیکی برابر با ۰/۱۱۱ بود و کمترین میزان بین دو جمعیت دوپلان و دورود با ضریب تشابه ۰/۷۱۱ و فاصله ژنتیکی ۰/۳۴۰ مشاهده شد (جدول ۹).

دندروگرام Neighbor Joining بر اساس Nei (۱۹۷۲)، جمعیت‌ها را در دو گروه مجزا دسته‌بندی کرد (شکل ۲). در این دسته‌بندی، گروه اول شامل جمعیت‌های کشکان، دوپلان و داوودعرب بود که دو جمعیت داوودعرب و دوپلان با میزان بوت‌استرپ ۶۷ درصد در زیر شاخه‌ای جدا از کشکان قرار گرفتند. جمعیت کنجان‌چم و دورود با بوت‌استرپ ۵۵ درصد در گروه دوم جای گرفتند. در این دندوگرام جمعیت دوپلان از حوضه کارون در کنار جمعیت داوودعرب از حوضه دیاله و جمعیت کنجان‌چم از حوضه دیاله در کنار جمعیت دورود از حوضه کارون قرار گرفته‌اند (شکل ۲). علاوه بر این، دندروگرام Neighbor Joining سه حوضه کارون، کرخه و دیاله بر اساس Nei (۱۹۷۲) نشان داد که دو حوضه کارون و کرخه مشابهت بیشتری با یکدیگر نشان می‌دهند (شکل ۳).

۰/۰۵ < P و درون جمعیت‌ها در سطح ۰/۰۰۱ < P کاملاً معنی‌دار بود. همچنین، تجزیه واریانس مولکولی در بین سه حوضه دیاله، کرخه و کارون نشان داد که ۰/۷۱ درصد از کل تنوع به تفاوت بین حوضه‌ها، ۱۶/۷۷ درصد به تفاوت بین افراد درون جمعیت‌ها و ۸۲/۵۱ درصد به تفاوت درون افراد تعلق دارد (جدول ۷). مقادیر P نشان داد که بین حوضه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (P > ۰/۰۵) در حالی که بین کل افراد درون جمعیت‌ها و درون افراد از نظر آماری در سطح ۰/۰۰۱ < P اختلاف معنی‌داری مشاهده شد.

میانگین F_{ST} در بین سه حوضه معنی‌دار نبود ($F_{ST} = ۰/۰۰۷۱$). مقادیر F_{ST} بین دو به دو حوضه‌ها گویای تفاوت معنی‌دار (P < ۰/۰۵) بین دو حوضه کرخه و دیاله بود. با وجود این، با در نظر گرفتن میزان عددی شاخص F_{ST} که کمتر از ۰/۰۵ است، جدایی بین دو حوضه بسیار اندک خواهد بود (جدول‌های ۷ و ۸). بیشترین میزان تشابه ژنتیکی بین دو جمعیت کنجان‌چم و دورود با ضریب تشابه برابر با ۰/۸۹۴ و

جدول ۶- ارزیابی تفاوت بین دو به دو جمعیت‌ها با استفاده از مقادیر F_{ST} . *** معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ < P، ** معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ < P و * معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ < P.

کشکان	دورود	دوپلان	کنجان‌چم	داوودعرب
کشکان	-----			
دورود	۰/۰۱۹*	-----		
دوپلان	۰/۰۲۱*	۰/۰۴۵***	-----	
کنجان‌چم	۰/۰۳۳**	۰/۰۳۵***	-----	
داوودعرب	۰/۰۱۵*	۰/۰۱۸	۰/۰۱۶*	-----

جدول ۷- تجزیه واریانس مولکولی داده‌های حاصل از نشانگر ریزماهوره بر اساس سه حوضه دیاله، کارون و کرخه در شاه کولی جنوبی

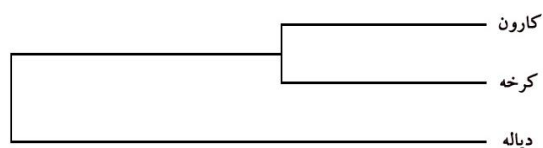
منبع تغییرات	درجه آزادی	جمع مجذورات	اجزای واریانس	درصد تنوع
بین حوضه‌ها	۲	۴/۴۷۶	۰/۰۰۸۷	۰/۷۱
بین افراد درون جمعیت‌ها	۱۴۴	۲۰۳/۹۲	۰/۲۰۵	۱۶/۷۷
درون افراد	۱۴۷	۱۴۸	۰/۰۰۶۸	۸۲/۵۱

جدول ۸- ارزیابی سطح معنی دار بودن اختلاف بین دو به دو حوضه‌ها با مقادیر F_{ST} . * معنی داری در سطح $P < 0.05$

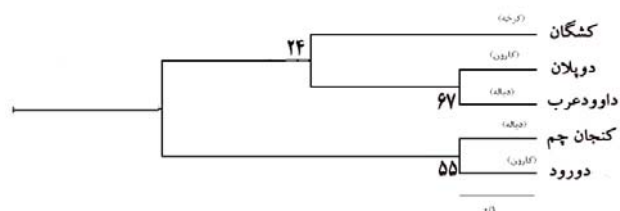
حوضه‌ها	کرخه	کارون	دیاله
کرخه	-----		
کارون	۰/۰۰۸۸	-----	
دیاله	۰/۰۲۱*	۰/۰۰۲۵	-----

جدول ۹- فاصله و تشابه ژنتیکی بر اساس Nei (۱۹۷۲) بین دو به دو جمعیت‌های مطالعه شده. مقادیر تشابه ژنتیکی در بالای قطر و مقادیر فاصله ژنتیکی در زیر قطر قرار دارند.

جمعیت‌ها	کشگان	دورود	کنجان‌چم	دوپلان	داوودعرب
کشگان	-----	۰/۸۳۵	۰/۷۶۳	۰/۷۶۱	۰/۸۰۶
دورود	۰/۱۷۹	-----	۰/۸۹۴	۰/۷۱۱	۰/۸۰۴
کنجان‌چم	۰/۲۶۹	۰/۱۱۱	-----	۰/۷۶۵	۰/۸۳۷
دوپلان	۰/۲۷۲	۰/۳۴۰	۰/۲۶۶	-----	۰/۸۳۱
داوودعرب	۰/۲۱۴	۰/۲۱۷	۰/۱۷۷	۰/۱۷۴	-----



شکل ۳- گروه‌بندی سه حوضه کارون، کرخه و دیاله بر اساس داده‌های ریزماهوره با استفاده از الگوریتم Neighbor Joining بر اساس Nei (۱۹۷۲) در پنج جمعیت شاه کولی جنوبی



شکل ۲- گروه‌بندی جمعیت‌های مطالعه شده بر اساس داده‌های ریزماهوره با استفاده از الگوریتم Neighbor Joining بر اساس Nei (۱۹۷۲).

بحث

گزارش شده است از آن جمله می‌توان به ارزیابی تنوع ژنتیکی ماهی *Rutilus rutilus* (Hamilton and Tyler, 2008) و *Telestes souffia* (Dubut et al., 2009a) و *Alburnus alburnus* (Dubut et al., 2010) اشاره کرد. به نظر می‌رسد با توجه به قرابت سیستماتیک گونه‌های اشاره شده، امکان استفاده از آنها برای شاه کولی جنوبی نیز میسر باشد.

هتروزیگوسیتی مورد انتظار، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و تنوع آللی، هر دو برای اندازه‌گیری تنوع

ارزیابی تنوع ژنتیکی گونه‌های بومی به ویژه انواعی که پراکنش وسیعی در کشور دارند همواره از اهمیت فراوانی برخوردار بوده است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که علیرغم استفاده از نشانگرهای غیراختصاصی، تنوع قابل توجهی درون جمعیت‌های مختلف شاه کولی جنوبی وجود دارد. در خصوص استفاده از نشانگرهای استفاده شده در این تحقیق تاکنون پژوهش‌های مختلفی در مورد سایر گونه‌های کپورماهیان در خارج از کشور

برخی موارد حضور آلل های منحصر به فرد نیز مشهود بود (جدول ۳)، اما با توجه به اینکه تفاوت معنی داری بین هتروزیگوسیتی مورد انتظار پنج جمعیت مشاهده نشد، می توان گفت این تعداد آلل منحصر به فرد برای ایجاد تنوع ژنتیکی متفاوت بین جمعیت ها کافی نیست. از دیگر دلایل عدم وجود تفاوت معنی دار بین هتروزیگوسیتی مورد انتظار پنج جمعیت، می توان به اختصاصی نبودن چهار جفت آغازگر مورد استفاده در این مطالعه نیز اشاره کرد.

در تعدادی از جایگاه ها، انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ مشاهده شد، عوامل متعددی نظیر اثر والاند (Wahlund effect) یا تلفیق داده های ژنتیکی از چند جمعیت با فراوانی های آللی متفاوت با یکدیگر، درون آمیزی، نمونه برداری غیر تصادفی و حضور آلل نول می تواند منجر به انحراف از تعادل شود (Castric *et al.*, 2002). از بین ۱۶ انحراف معنی دار از تعادل هاردی-وینبرگ، ۵ انحراف، کاهش هتروزیگوسیتی (فقط در جایگاه ژنی BL1-98) را نشان دادند (جدول ۵). نشانگر BL1-98 دارای آلل نول با فراوانی مورد انتظار برابر با ۰/۳۷۹۸ بود. این محاسبه فرض می کند که آلل نول در نشانگر BL1-98 پاسخی برای کاهش هتروزیگوسیتی و انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ در این جایگاه ژنی است. انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ در سایر جایگاه ها احتمالاً ناشی از نا کافی بودن تعداد نمونه است. تعداد کافی نمونه به نوع نشانگر بستگی دارد، هر چه نشانگری متغیرتر باشد، تعداد نمونه های بیشتری برای بررسی آن مورد نیاز است. برای مثال، ارزیابی نشانگرهای آلوزایمی که به یک تا شش آلل در هر جایگاه محدود می شوند، تنها با نمونه برداری از ۳۰-۵۰ فرد، به خوبی امکان پذیر است. در مقابل،

ژنتیکی به کار می روند (Silverstein *et al.*, 2004). هتروزیگوسیتی و تعداد آلل ها از شاخص های مهم تنوع ژنتیکی جمعیت ها از لحاظ روبرو شدن با تغییرات محیطی هستند و ویژگی هایی همچون قابلیت رقابت و توانایی یک موجود برای بقا در زیستگاه های طبیعی را تعیین می کنند. در بررسی های تنوع ژنتیکی، غنای آللی نسبت به هتروزیگوسیتی دارای ارزش بیشتری است. در واقع، بالا بودن غنای آللی نشان دهنده بالا بودن اندازه مؤثر جمعیت است و استفاده از غنای آللی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در جمعیت هایی که برای برنامه های به گزینی یا حفاظت انتخاب شده اند، مناسب تر خواهد بود (Freeland, 2005).

در پژوهش حاضر، تنوع ژنتیکی پنج جمعیت شاه کولی جنوبی شایان توجه بود (تعداد آلل مشاهده شده = ۸/۸۵، تعداد آلل مؤثر = ۶/۴۶، هتروزیگوسیتی مورد انتظار = ۰/۸۲۵، هتروزیگوسیتی مشاهده شده = ۰/۷۵). در گزارش DeWoody و Avise (۲۰۰۰) بررسی حدود ۴۰۰۰ فرد از ۷۸ گونه از ماهیان آب شیرین با استفاده از ۵۲۴ نشانگر ریزماهوره، هتروزیگوسیتی مورد انتظار برابر با ۰/۴۶ و تعداد آلل مؤثر برابر با ۷/۵ برآورد گردید که در مقایسه با مطالعه حاضر، هر دو شاخص بررسی شده مقادیر پایین تری را نشان دادند. تنوع ژنتیکی بالای شاه کولی جنوبی می تواند ناشی از عدم صید تجاری، زیستگاه های نسبتاً مطلوب و امکان تکثیر و تولید مثل طبیعی جمعیت ها باشد. بررسی های مختلف همگی بیانگر تأثیر مخرب صید و تکثیر مصنوعی و نابودی زیستگاه بر تنوع ژنتیکی ذخایر وحشی ماهیان هستند (Beaumont and Hoare, 2003).

همپوشانی قابل ملاحظه ای در آلل های موجود در هر جایگاه ژنی بین جمعیت ها مشاهده شد. اگرچه در

برابر با $7/11$ برآورد شد. به طور کلی، در صورتی که $N_m > 1$ باشد، تفاوت ایجاد شده به وسیله رانش ژنتیکی (genetic drift) متوقف می‌شود. به طور تئوری چنانچه میزان N_m کوچکتر از ۱ باشد، آنگاه رانش ژنتیکی عامل اصلی تفاوت ژنتیکی است و تفاوت‌های زیادی در فراوانی آللی جمعیت‌ها مشاهده می‌شود و در نتیجه مقدار F_{ST} بزرگ خواهد بود. در مقابل، اگر میزان N_m بزرگتر از ۱ باشد، جریان ژنی (gene flow) تمایل به غلبه بر رانش ژنتیکی دارد بنابراین، تفاوت ژنتیکی کم و F_{ST} نزدیک به صفر خواهد بود (Li et al., 2007). در مورد جریان ژنی بالا و کم بودن تفاوت ژنتیکی بین پنج جمعیت شاه کولی جنوبی دو احتمال وجود دارد: احتمال نخست این است که در اثر سیلابی شدن رودخانه‌های کارون، کرخه و دیاله، شاه کولی جنوبی به سمت پایین‌دست رودخانه‌ها کشیده شده، سپس از طریق دجله مجدداً به درون رودخانه‌های مختلف مهاجرت می‌کند. سه رودخانه کارون، کرخه و دیاله در عراق به رودخانه بزرگ دجله می‌ریزند (ارتباط رودخانه کرخه با رودخانه دجله موقتی است و در زمان سیلابی شدن با رودخانه دجله ارتباط پیدا می‌کند). اما این پدیده با توجه به ویژگی‌های زیستی شاه کولی جنوبی چندان محتمل نیست، چراکه این گونه ماهی با جثه کوچک، نسبتاً کم تحرک است و احتمال جابه‌جایی وسیع برای آن ضعیف است. احتمال دوم که بر اساس زمان جدایی و چند تکه شدن زیستگاه این ماهی بحث می‌کند، می‌تواند به واقعیت نزدیک‌تر باشد. به بیان دیگر، زمان جدایی زیستگاه‌ها از یکدیگر هنوز برای ایجاد تفاوت بین افراد در ایستگاه‌های مختلف کافی نیست. به طور کلی، می‌توان بیان داشت که تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف شاه کولی جنوبی، از نظر

جایگاه‌های ریزماهوره اغلب دارای ۱۰ تا ۵۰ آلل هستند، در چنین حالتی با نمونه برداری از تنها ۳۰ فرد، احتمال خطا در محاسبه فراوانی آللی وجود خواهد داشت (Beaumont and Hoare, 2003). علاوه بر این، عوامل دیگری نظیر مهاجرت می‌تواند به انحراف از تعادل منجر شود. در این مطالعه، تعداد افراد مهاجر بین حوضه‌ها به طور میانگین حدود ۷ فرد در هر نسل برآورد شد که عدد نسبتاً بزرگی است و می‌تواند توجیه‌کننده انحراف از تعادل باشد.

در پنج جمعیت مطالعه شده، مقادیر آماره F_{IS} بیش از ۰/۰۵ بود. بر اساس مطالعه منتشر شده در سال ۱۹۹۴ اگر میانگین F_{IS} بزرگتر از ۰/۰۵ باشد، جفت‌گیری از نوع غیرتصادفی است (Ward et al., 1994). در سه جایگاه ژنی $CypG24$ ، $BL1-2b$ و $Rser10$ مقادیر F_{IS} منفی بود که نشان‌دهنده افزایش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار است. هنگامی که مقدار F_{IS} برابر با صفر باشد، درون‌آمیزی وجود ندارد اما هنگامی که F_{IS} به ۱ نزدیک شود، تعداد افراد درون‌آمیز در جمعیت افزایش می‌یابد، هر چند کاهش هتروزیگوسیتی همیشه دلیل بر درون‌آمیزی نیست و عوامل دیگری مثل اثر والانند، حضور آلل نول و انتخاب طبیعی نیز ممکن است در این زمینه مؤثر باشد (Freeland, 2005).

جدایی جغرافیایی، محیط زیست، پدیده گردن بطری (bottle neck)، جریان ژنی و انتخاب تأثیرات شگرفی بر ساختار جوامع دارند (Li et al., 2007). ارزیابی تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها با کمک مقادیر F_{ST} بیانگر اختلاف اندک اما معنی‌دار در مقایسه دو به دو ۷ جفت از جمعیت‌ها بود. در این پژوهش، میانگین جریان ژنی بین جمعیت‌های شاه کولی جنوبی

معنی داری مشاهده شد ($P < 0.05$). به طور کلی، دو حوضه کارون و کرخه شباهت بیشتری به هم داشتند و حوضه دیاله از دو حوضه دیگر متفاوت بود. جدایی جغرافیایی و مرزهای فیزیکی از طریق محدود کردن مهاجرت می‌توانند باعث افزایش تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها شوند که به تدریج به تغییراتی در ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها منجر می‌شود. به طور کلی، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تنوع ژنتیکی نسبتاً مطلوبی در جمعیت‌های مختلف شاه‌کولی جنوبی در مناطق بررسی شده وجود دارد. علاوه بر این، تمایز ژنتیکی اندک اما معنی‌داری بین حوضه‌های مختلف دیده شد که مدیریت ذخایر مجزا را ایجاب می‌کند. در پایان، پیشنهاد می‌شود به منظور بررسی کامل‌تر جمعیت‌های شاه‌کولی جنوبی در مناطق پراکنش آن، نمونه‌برداری با تعداد بیشتر و به صورت چند ایستگاه در یک رودخانه صورت گیرد و از تعداد جایگاه‌های بیشتری به منظور ارزیابی دقیق تنوع استفاده شود.

چهار شاخص: هتروزیگوسیتی مورد انتظار، هتروزیگوسیتی مشاهده شده، تعداد آلل مشاهده شده و تعداد آلل مؤثر بسیار قابل توجه است. اگرچه جمعیت‌ها از نظر این چهار شاخص بسیار به یکدیگر شبیه بودند. شباهت ویژگی‌های زیستگاه‌های پنج جمعیت کشگان، دورود، کنجان‌چم، دوپلان و داوودعرب می‌تواند تأییدکننده این شباهت ژنتیکی باشد. علاوه بر این، اگرچه تفاوت معنی‌داری در تنوع ژنتیکی بین پنج جمعیت مشاهده نشد اما جمعیت‌ها تفاوت ژنتیکی اندک اما معنی‌داری را نشان می‌دهند. علت پایین بودن تفاوت ژنتیکی بین پنج جمعیت، می‌تواند ناشی از جریان ژنی بالا بین آنها و اندازه جمعیت مؤثر قابل توجه در این گونه باشد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نیز با توزیع ۸۲/۴ درصدی تنوع درون افراد بیانگر همین موضوع است. اگرچه میانگین تفاوت ژنتیکی در بین سه حوضه معنی‌دار نبود، ولی بین دو حوضه کرخه و دیاله تفاوت

منابع

- Abdoli, A. (2000) The inland water fishes of Iran. Nature and wildlife museum of Iran, Tehran (in Persian).
- Beaumont, A. R. and Hoare, K. (2003) Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. Blackwell Publishing Company, Oxford.
- Castric, V., Bernatchez, L., Belkhir, K. and Bonhomme, F. (2002) Heterozygote deficiencies in small lacustrine populations of brook charr *Salvelinus fontinalis* Mitchell (Pisces, Salmonidae): a test of alternative hypotheses. *Heredity* 89: 27-35.
- DeWoody, J. A. and Avise, J. C. (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* 56: 461-473.
- Dubut, V., Martin, J. F., Costedoat, C., Chappaz, R. and Gilles, A. (2009a) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the freshwater fishes *Telestes souffia* and *Telestes muticellus* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Ecology Recourses* 9: 1001-1005.
- Dubut, V., Martin, J. F., Gilles, A., Van Houdt, J., Chappaz, R. and Costedoat, C. (2009b) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the dace complex: *Leuciscus leuciscus* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Ecology Recourses* 9: 1179-1183.
- Dubut, V., Sinama, M., Martin, J., Meglécz, E., Fernandez, J., Chappaz, R., Gilles, A. and Costedoat, C. (2010) Cross-species amplification of 41 microsatellites in European cyprinids: a tool for

- evolutionary, population genetics and hybridization studies. *Bio Med Central Research Notes* 3(135): 1-9.
- Ergene, S. (1993) The growth rates of *Chalcalburnus mossulensis* Heckel, 1843, (Pisces, Cyprinidae) in Karasu. *Turkish Journal of Zoology* 17: 367-377.
- Freeland, J. R. (2005) *Molecular ecology*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
- Hamilton, P. B. and Tyler, C. R. (2008) Identification of microsatellite loci for parentage analysis in roach *Rutilus rutilus* and eight other cyprinid fish by cross-species amplification, and a novel test for detecting hybrids between roach and other cyprinids. *Molecular Ecology Notes* 8: 462-465.
- Li, D., Kang, D., Yin, Q., Sun, X. and Liang, L. (2007) Microsatellite DNA marker analysis of genetic diversity in wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Genetics and Genomics* 34: 984-993.
- Liu, K. and Muse, V. (2004) PowerMarker: integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21: 2128-2129.
- Mousavi, M. A. (2011) Morphological diversity of *Alburnus mossulensis* Heckel, 1843 in Iran. MSc thesis, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran (in Persian).
- Nei, M. (1972) Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Okumus, I. and Ciftci, Y. (2003) Fish population genetics and molecular markers: II-Molecular markers and their application in fisheries and aquaculture. *Turkish Journal of fisheries and Aquaculture Sciences* 3: 51-79.
- 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.
- Raymond, M. and Rousset, F. (1995) GENEPOP, version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicist. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Reddy, M. P., Sarla, N. and Siddiq, E. A. (2002) Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Rohlf, F. J. (2000) NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate system (v. 2.1). user guide. Exeter Software, Setauket, New York.
- Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L. (2000) Arlequin: a software for population genetics data analysis, version 2.000. University of Geneva, Geneva.
- Silverstein, J. T., Rexroad, C. E. and King, T. L. (2004) Genetic variation measured by microsatellites among three strains of domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture Research* 35: 40-48.
- Ward, R. D., Woodwark, M. and Skibinski, D. O. F. (1994) A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology* 44: 213-232.

معرفی برخی گونه‌های حشرات راسته طیاره‌ماندها (Insecta: Odonata) از شمال ایران

الهام یوسفی لفورکی، فاطمه راسخی و معصومه شایان مهر*
گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

چکیده

راسته طیاره‌ماندها (Odonata) از گروه باستان‌بالان (Paleoptera) و شامل سه زیرراسته: Anisozygoptera، آسیابک‌ها (Anisoptera)، و سنجاقک‌ها (Zygoptera) هستند. برای بررسی فون این حشرات در استان مازندران حشرات بالغ این راسته از زیستگاه‌های مختلف جمع‌آوری و شناسایی گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده شامل ۱۳ گونه از ۱۰ جنس متعلق به ۷ خانواده و ۲ زیرراسته هستند. ۷ گونه متعلق به زیرراسته Anisoptera و ۶ گونه متعلق به زیرراسته Zygoptera هستند. در بین گونه‌های معرفی شده آنهایی که با علامت * مشخص شده، برای نخستین بار از استان مازندران گزارش می‌شوند. فهرست گونه‌های جمع‌آوری شده در این پژوهش به شرح زیر است: *Coenagrion*، *Calopteryx splendens orientalis*،**Calopteryx splendens intermedia*،**Anax parthenope*، *Libellula*،**Lestes virens*،**Ischnura pumilio*،**Epallage fatime*، *Crocothemis erythraea*،**vanbrinckae*، *Sympetrum fonscolombei*،**Platycnemis dealbata*، *Orthetrum sabina*، *Orthetrum albistylum*،**depressa*، *Sympetrum striolatum*

واژه‌های کلیدی: آسیابک‌ها، باستان‌بالان، سنجاقک‌ها، طیاره‌ماندها، ایران

مقدمه

و Morton (۱۹۲۱) گونه‌های دیگری از این راسته را از ایران گزارش نمودند و Schmidt (۱۹۵۴) فهرستی از گونه‌های Odonata ایران را که تا آن زمان گزارش شده بود ارائه داد (Sadeghi, 2010). در سال‌های بعد گونه‌های بیشتری از ایران گزارش شد به طوری که Heidari و Dumont (۲۰۰۲) فهرست جدیدتری از Odonata ایران ارائه نمودند که شامل ۹۵ گونه گزارش

طیاره‌ماندها (Odonata) شامل سه زیرراسته: Anisozygoptera، Anisoptera (آسیابک‌ها) و Zygoptera (سنجاقک‌ها) است. نخستین گزارش در مورد فون Odonata از ایران توسط Selys-Longchamp (۱۸۸۷) ارائه شده است (Sadeghi, 2010). پژوهشگران دیگری همچون Ris (۱۹۰۶-۱۹۱۶)

نخستین بار از استان فارس گزارش نمود. پژوهش حاضر با توجه به اهمیت حشرات این راسته و به منظور بررسی گونه‌های جدید انجام شده است.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی فون حشرات راسته Odonata نمونه‌برداری‌های متعدد از حاشیه آبگیرها، رودهای کوچک، کانال‌ها و نهرهای شهرستان ساری و نور انجام شد. نمونه‌گیری توسط تور حشره‌گیری دستی انجام شد. اطلاعات مربوط به هر نمونه از جمله تاریخ و محل جمع‌آوری ثبت شد (جدول ۱). سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. حشرات توسط سیانور کشته شدند. از آنجا که بخش‌های مختلف بدن برای شناسایی اهمیت دارد، هنگام کار با نمونه‌ها با دقت فراوان از آسیب به آنها جلوگیری شد. شناسایی اولیه با کلیدهای Dumont (۱۹۹۱) و Theischinger (۲۰۰۹) صورت گرفت. سپس تعدادی از نمونه‌ها برای تأیید توسط پروفیسور Dumont به کشور بلژیک فرستاده شد.

شده طی سال‌های ۱۹۴۵ تا ۱۹۹۵ بود. این فهرست بر اساس مطالعات انجام شده توسط پژوهشگران قبلی از جمله: Schmidt و Lohman, Blim نوشته شده است (Ebrahimi et al., 2009).

بیشترین مطالعات در تعیین فون Odonata ایران طی سال‌های اخیر صورت گرفته است. برای نخستین بار، Sadeghi و Domunt (۲۰۰۴) گونه *Libellula fulva pontica* Selys, 1887 را از ایران گزارش کردند. Ebrahimi و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی فون این راسته در استان کرمان پرداختند و ۱۸ گونه جدید برای این استان معرفی نمودند. Minaei و Kiany (۲۰۰۹) خانواده Libellulidae را در استان فارس بررسی و ۲ جنس و ۷ گونه جدید را برای این استان گزارش نمودند. همچنین، آنها کلید شناسایی گونه‌های مربوط به این خانواده را ارائه نمودند. Sadeghi و Mohammadalizadeh (۲۰۰۹) به مطالعه فون Odonata ایران پرداختند که نتیجه آن، گزارش سه گونه جدید برای ایران بود. Sadeghi (۲۰۱۰) فون Odonata استان فارس را مطالعه و ۹ گونه را برای

جدول ۱- مشخصات گونه‌های جمع‌آوری شده از راسته طیاره‌ماندها از شمال کشور

گونه	محل جمع‌آوری	تاریخ جمع‌آوری	ارتفاع از سطح دریا (متر)	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
<i>Anax parthenope</i>	ساری	۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰	۱۳۲	53°:06'	36°:33'
<i>Calopteryx splendens</i>	ساری	۱۳۸۸ و ۱۳۸۹	۱۳۲	53°:06'	36°:33'
<i>Calopteryx splendens intermedia</i>	ساری	۱۳۸۸ و ۱۳۸۹	۱۳۲	53°:06'	36°:33'
<i>Calopteryx splendens orientalis</i>	ساری	۱۳۸۸ و ۱۳۸۹	۱۳۲	53°:06'	36°:33'
<i>Coenagrion vanbrinckae</i>	ساری	۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰	۱۳۲	53°:06'	36°:33'
<i>Crocothemis erythraea</i>	ساری و نور	۱۳۸۹	۱۳۲ و ۱۶۷۰	53°:06' 51°:26'	36°:33' 36°:47'
<i>Epallage fatime</i>	ساری	۱۳۹۰	۱۳۲	53°:06'	36°:33'
<i>Ischnura pumilio</i>	ساری	۱۳۹۰	۱۳۲	53°:06'	36°:33'
<i>Lestes virens</i>	ساری	۱۳۹۰	۱۳۲	53°:06'	36°:33'
<i>Libellula depressa</i>	نور	۱۳۹۰	۱۶۷۰	51°:26'	36°:47'
<i>Orthetrum albistylum</i>	ساری	۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰	۱۳۲	53°:06'	36°:33'
<i>Orthetrum sabina</i>	ساری و نور	۱۳۹۰	۱۳۲ و ۱۶۷۰	53°:06' 51°:26'	36°:33' 36°:47'
<i>Platycnemis dealbata</i>	ساری	۱۳۹۰	۱۳۲	53°:06'	36°:33'
<i>Sympetrum fonscolombii</i>	ساری	۱۳۸۹ و ۱۳۹۰	۱۳۲	53°:06'	36°:33'
<i>Sympetrum striolatum</i>	ساری	۱۳۹۰	۱۳۲	53°:06'	36°:33'

نتایج و بحث

با بررسی گونه‌های حشرات راسته Odonata در دو شهرستان ساری و نور، طی سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۹۰ در مجموع، ۱۳ گونه از ۷ خانواده و ۲ زیرراسته شناسایی شد که شرح گونه‌ها به صورت زیر است:

زیرراسته Anisoptera

از زیرراسته Anisoptera، دو خانواده، پنج جنس و هفت گونه جمع‌آوری شد. بیشتر نمونه‌های جمع‌آوری شده در این تحقیق مربوط به خانواده Libellulidae است.

خانواده Libellulidae

از این خانواده در مجموع چهار جنس و شش گونه شناسایی شد.

جنس *Crocothemis* Brauer, 1868

افراد نر این جنس تقریباً قرمز رنگ و ماده‌ها قهوه‌ای کم‌رنگ یا نارنجی هستند. پاهای کوچک و شکم منقبض دارند. بال‌ها شفاف و دارای یک لکه کهربایی در قاعده هستند. آرکولوس (arculus) بین رگبال‌های عرضی آنته‌نودال (antenodal) اول و دوم قرار گرفته است. آخرین رگ آنته‌نودال کامل نیست و دارای پترواستیگمای (pterostigma) بزرگ هستند (Kiany and Minaei, 2009).

گونه *Crocothemis erythraea* (Brullé, 1832)

در افراد نر بال‌ها شفاف و رگبال‌ها مایل به قرمز هستند. یک لکه کهربایی در قاعده بال عقب وجود دارد. پترواستیگما بلند و به رنگ زرد یا قهوه‌ای است (Dumont, 1991). چهار بند اول شکم مایل به زرد و بندهای انتهایی شکم تیره رنگ است. یک نوار تیره در قسمت میانی بندهای شکم وجود دارد. از این گونه، سه حشره نر و یک حشره ماده از شهرستان نور و ساری جمع‌آوری شده است (شکل ۱). اندازه بدن افراد این

گونه تقریباً ۴ سانتی‌متر است. این گونه در ایران پراکنش وسیع دارد و قبلاً از استان مازندران، شهرستان‌های قائمشهر و آمل و همچنین از استان‌های بوشهر، چهارمحال و بختیاری، خوزستان، سیستان و بلوچستان، فارس، کرمان، کهگیلویه و بویراحمد، گیلان، لرستان و هرمزگان نیز گزارش شده است.

جنس *Libellula* Linnaeus, 1758

در افراد این جنس قسمتی از بال‌ها رنگی است. پیش‌قفس سینه دارای یک لب عقبی کوچک است. پاهای کوتاه، بال‌ها بلند و به شکل متراکمی مشبک است. هامولوس (hamulus) در نرها کوچک و نامشخص است. صفحات مخرجی در ماده‌ها کوچک است. ممبرانولا (membranula) خوب رشد کرده، پترواستیگما اندازه‌های متنوعی دارد (Dumont, 1991).

گونه *Libellula depressa* (Linnaeus, 1758)

در بال جلو یک نوار باریک به رنگ قهوه‌ای تیره وجود دارد که بین رگبال subcostal و anal از قاعده بال تا قاعده سلول دیسکوئیدال (discooidal cell) (مثلاً بال) کشیده شده است (Dumont, 1991). یک لکه قهوه‌ای رنگ روی هر یک از بال‌ها وجود دارد. لکه بال عقب مثلی شکل و بزرگتر از لکه بال جلو است. اندازه بدن افراد این گونه تقریباً ۴/۸ سانتی‌متر است. دو حشره نر این گونه از شهرستان نور جمع‌آوری شده است و علاوه بر استان مازندران قبلاً از استان‌های سمنان، سیستان و بلوچستان، قزوین، کرمان، گلستان و گیلان نیز گزارش شده است (شکل ۲).

جنس *Orthetrum* Newmann, 1883

پیشانی پهن تر از کلیئوس (clypeus) است. فرق سر دارای یک شیار است. لبه پشتی سپر پیش‌سینه‌ای بزرگ، راست، مودار است. شکم دارای اشکال مختلفی است و اغلب از بند سوم منقبض شده است.

کرمان، گلستان، گیلان و هرمزگان نیز گزارش شده است. بنابراین، پراکنش وسیعی در ایران دارد. در این تحقیق، ۸ نمونه از جنس نر و ۹ نمونه از حشره ماده از شهرستان‌های نور و ساری جمع‌آوری و شناسایی شد (شکل ۳).

گونه *Orthetrum albistylum* (Selys, 1848)

روی درز هیومرال (humeral suture) نخستین و دومین درز جانبی سینه نوارهای سیاه وجود دارد. بندهای یک تا سه شکم گرز مانند است (Kim et al., 2009). چهار تا پنج بند شکم لاجوردی رنگ است. این گونه تاکنون تنها از استان‌های آذربایجان شرقی، گلستان و گیلان گزارش شده است. در این تحقیق یک نمونه از جنس نر از شهرستان ساری جمع‌آوری و گزارش شد (شکل ۴).



شکل ۲- جنس نر گونه *Libellula depressa* (اصلی)



شکل ۳- جنس نر (راست) و جنس ماده (چپ) گونه *Orthetrum Sabina* (اصلی)

جنس *Sympetrum* Newman, 1833

افراد این جنس نسبتاً کوچک بوده، به رنگ‌های زرد، قهوه‌ای و مایل به قرمز با لکه‌های سیاه هستند. بال‌ها شفاف هستند و یا لکه‌های قهوه‌ای و زرد دارند. پاها بلند و باریک، شکم استوانه‌ای شکل و بال‌ها نسبتاً کوتاه و پهن هستند. سلول دیسکوئیدال در بال جلو

لامینا (lamina) معمولاً به سمت جلو کشیده شده است. صفحات مخرجی اندکی رشد یافته‌اند. در نرهای بالغ ناحیه شکم و سینه با گرد آبی رنگ پوشیده شده است (Kiany and Minaei, 2009).

گونه *Orthetrum sabina* (Drury, 1770)

اندازه بدن افراد گونه به طور متوسط ۵/۳ سانتی‌متر است. در این گونه، ممبرانولا به رنگ قهوه‌ای تیره یا سیاه است. حداقل اثری از یک لکه کهربایی در قاعده بال عقب دیده می‌شود. قاعده شکم در بند اول و دوم به شکل پیازی متورم شده و به طور ناگهانی در بند سوم شکم منقبض می‌شود (Dumont, 1991). این گونه قبلاً از استان مازندران و همچنین از استان‌های آذربایجان شرقی، بوشهر، تهران، خوزستان، سیستان و بلوچستان، فارس،



شکل ۱- جنس نر گونه *Crocothemis erythraea* (اصلی)



شکل ۴- جنس نر گونه *Orthetrum albistylum* (اصلی)



گلستان، گیلان و لرستان نیز گزارش شده است.

گونه *Sympetrum striolatum* (Charpentier, 1840)

پیشانی به رنگ زرد بوده، هیچ طرحی روی آن وجود ندارد. نوارهای باریک سیاه روی درز هیومرال و دومین درز جانبی سینه دیده می‌شود. نخستین درز جانبی از زیر شروع شده، تا یک سوم مسیر به سمت بالا ادامه می‌یابد و به دومین درز شکمی متصل می‌شود. رنگ شکم نرها قرمز و در ماده‌ها زرد مایل به قرمز است (Kim et al., 2009). استیگما بزرگ و مایل به قهوه‌ای است. یک حشره ماده از این گونه از شهرستان ساری جمع‌آوری شده است (شکل ۶) و قبلاً از استان‌های آذربایجان شرقی، خراسان، خوزستان، گلستان، گیلان و مازندران نیز گزارش شده است.



شکل ۶- جنس ماده گونه *Sympetrum striolatum* (اصلی)

بالایی بند دوم و سوم شکم آبی روشن و زیر آنها سفید مایل به نقره‌ای است. بند چهارم شکم قهوه‌ای روشن است و لکه چهارگوش در طرفین بدن دارند (Kim et al., 2009). افراد این گونه دارای اندازه‌های بزرگ، در حدود ۷ سانتی متر هستند. بال‌ها در قسمت میانی مایل به زرد است. این گونه قبلاً از استان مازندران گزارش شده است و از استان‌های سیستان و بلوچستان، فارس، قزوین، کرمان و گیلان نیز گزارش شده است. در این تحقیق دو حشره نر این گونه از شهرستان ساری جمع‌آوری شد (شکل ۷).

باریک است و در بال عقب در قاعده آرکولوس قرار گرفته است (Dumont, 1991).

گونه *Sympetrum fonscolombii* (Selys, 1840)

در قاعده بال عقب یک لکه کهربایی وجود دارد که در عرض رگبال عرضی کویتو-آنال (cubito-anal) و در طول ممبرانولا امتداد یافته است (Dumont, 1991). دو نمونه از حشره ماده این گونه از شهرستان ساری جمع‌آوری و شناسایی شد (شکل ۵). اندازه بدن آنها حدود ۴/۲ سانتی متر است. این گونه قبلاً از مازندران گزارش شده است و همچنین از استان‌های آذربایجان شرقی، اصفهان، بوشهر، چهارمحال و بختیاری، خراسان، خوزستان، سمنان، سیستان و بلوچستان، فارس، قزوین، کردستان، کرمان، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد،



شکل ۵- جنس ماده گونه *Sympetrum fonscolombii* (اصلی)

خانواده Aeschnidae

جنس *Anax* Leach, 1815

افراد این جنس شامل بزرگترین گونه‌های راسته هستند. در هر دو بال آخرین انشعاب اصلی رگ IR3 در مقابل یا نزدیک انتهای دورتر پترواستیگما قرار گرفته است. لبه بال عقب در هر دو جنس گرد شده است. نرها فاقد مثلث آنال (anal triangle) بال هستند (Theischinger, 2009).

گونه *Anax parthenope* (Selys, 1839)

هیچ طرحی روی قفس سینه وجود ندارد. سطح

نودوس (nodus) گسترش یافته است. در این زیر گونه، ماده‌ها یک لکه قهوه‌ای بزرگ و پترواستیگمای کاذب سفید و بزرگ روی بال دارند (Dumont, 1991). بدن نرها آبی و ماده‌ها سبز فلزی است. شکل بال در این گونه در جمعیت‌های مناطق جغرافیایی مختلف دارای تفاوت‌هایی است (Sadeghi et al., 2009). لکه روی بال‌ها در ماده‌ها نسبت به نرها روشن‌تر و مایل به سبز است. این زیر گونه برای نخستین بار از مازندران گزارش می‌شود. سه حشره نر و دو ماده هموکروم این گونه از شهرستان ساری جمع‌آوری و شناسایی شدند (شکل‌های ۸ و ۹). اندازه بدن افراد این زیر گونه حدود ۴/۳ سانتی متر است. این زیر گونه قبلاً از استان‌های تهران، سیستان و بلوچستان، فارس، قم، کردستان، کرمان، کرمانشاه و گیلان گزارش شده است.

زیر گونه *Calopteryx splendens orientalis* Selys, 1887

اندازه بدن افراد این زیر گونه حدود ۶ سانتی متر است. لکه روی بال‌های این زیر گونه در مقایسه با زیر گونه قبلی کوچکتر است. سه حشره نر و یک ماده هموکروم این گونه از شهرستان ساری جمع‌آوری شده است (شکل ۱۰). این زیر گونه قبلاً از استان‌های سمنان، کردستان، گلستان، گیلان و مازندران نیز گزارش شده است.

خانواده *Coenagrionidae*

از این خانواده دو جنس و دو گونه جمع‌آوری شد.

جنس *Coenagrion* Kirby, 1890

نرها به رنگ آبی لاجوردی با لکه‌های سیاه و ماده‌ها به رنگ سبز یا آبی هستند. بال‌های شفاف دارند. پترواستیگما در بال‌ها مشابه است. ۸ تا ۱۱ رگ آنتی‌نودال در بال جلویی دارند. سلول دیسکوئیدال نوک تیز شده، آرکولوس کنار رگ آنتی‌نودال دوم قرار گرفته است (Dumont, 1991).



شکل ۷- جنس نر گونه *Anax parthenope* (اصلی)

زیر راسته *Zygoptera*

از این زیر راسته، پنج خانواده، شش جنس، شش گونه و دو زیر گونه جمع‌آوری شد.

خانواده *Calopterygidae*

از این خانواده یک گونه و دو زیر گونه شناسایی شد.

جنس *Calopteryx* Leach, 1815

افراد این جنس اندازه‌های متوسط و بدنی به رنگ سبز یا آبی درخشان دارند. ماده‌ها ممکن است پترواستیگمای کاذب سفید داشته باشند. در افراد نر ضمایم بالای (superior appendages) مخرج تقسیم نشده و ساده است. ضمایم پایینی (inferior appendages) استوانه‌ای و صاف بوده، حدود دو سوم طول ضمایم بالایی است (Dumont, 1991).

گونه *Calopteryx splendens* (Harris, 1782)

نرها به رنگ آبی فلزی و دارای یک بخش تیره در هر بال هستند. رگبال‌ها در افراد نر آبی رنگ است. ماده‌ها دارای رگبال‌ها و بدن سبز رنگ هستند. افراد ماده دارای پترواستیگمای سفید رنگ در هر بال هستند (Dumont, 1991). این گونه قبلاً از استان‌های تهران، سمنان، سیستان و بلوچستان، فارس، قم، کردستان، کرمان، کرمانشاه، گلستان، گیلان، مازندران و همدان گزارش شده است. از این گونه دو زیر گونه در ایران وجود دارد.

زیر گونه *Calopteryx splendens intermedia* Selys, 1887

در نرها لکه بال بین نوک بال و ۵ تا ۲۰ سلول انتهایی

گونه *Ischnura pumilio* (Charpentier, 1825)

پترواستیگما در بال‌های جلو و عقب شکل‌های متفاوتی دارند و در بال جلویی بزرگتر است. پترواستیگمای بال جلو در افراد نر در بخش قاعده‌ای سیاه و در بخش انتهایی روشن است و در بال عقب زرد کم رنگ است (Dumont, 1991). اندازه بدن افراد گونه حدود ۳/۲ سانتی‌متر است. یک حشره ماده (شکل ۱۲) از این گونه از شهرستان ساری جمع‌آوری شده است. این گونه از استان‌های آذربایجان شرقی، سمنان، فارس، کردستان، کرمان، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد، گلستان، گیلان و مازندران گزارش شده است.

گونه *Coenagrion vanbrinckae* Lohmann, 1993

استیگمای بال جلو و عقب هم اندازه و هم شکل هستند. طرفین قفس سینه و پاها مایل به آبی است. شکم از بند چهارم به بعد در قسمت‌های جانبی قهوه‌ای رنگ است. در این مطالعه دو حشره ماده این گونه از شهرستان ساری جمع‌آوری شد (شکل ۱۱). این گونه قبلاً از استان‌های آذربایجان شرقی، فارس، کرمان و لرستان نیز گزارش شده است.

جنس *Ischnura* Charpentier, 1840

بخش مرکزی لبه پشتی سپر پیش سینه‌ای کوچک یا گرد شده و یا به صورت لبه برجسته‌ای در آمده است. لبه عقبی در بخش شکمی بند هشتم ماده‌ها دارای خار است (Theischinger, 2009).



شکل ۱۰- جنس نر زیرگونه *Calopteryx splendens orientalis* (اصلی)



شکل ۹- جنس ماده زیرگونه *Calopteryx splendens intermedia* (اصلی)



شکل ۸- جنس نر زیرگونه *Calopteryx splendens intermedia* (اصلی)



شکل ۱۲- جنس ماده گونه *Ischnura pumilio* (اصلی)



شکل ۱۱- جنس ماده گونه *Coenagrion vanbrinckae* (اصلی)

فاصله در دو طرف سر قرار گرفته‌اند. بال‌ها هم شکل، غشایی و کاملاً شفاف به جز نوک بال که یک لکه قهوه‌ای هلالی شکل دارد. در نرها قفس سینه به رنگ

خانواده *Euphaeidae*

جنس *Epallage* Charpentier, 1840

دارای چشم‌های نسبتاً کوچک و نیم کروی که با

گونه *Lestes virens* (Charpentier, 1825)

این گونه برای نخستین بار از مازندران گزارش می‌شود. افراد این گونه دارای پترواستیگمای قهوه‌ای رنگ با حاشیه سفید و زایده‌های مخرجی مایل به زرد هستند. یک حشره ماده از این گونه از ساری جمع‌آوری شده است (شکل ۱۴). این گونه قبلاً از استان‌های چهارمحال و بختیاری، سیستان و بلوچستان و گیلان نیز گزارش شده است.

خانواده *Platynemididae***جنس *Platynemis* Burmeister, 1839**

افراد این جنس دارای پترواستیگمای اریب الماسی شکل هستند. در نرها ضمایم بالایی مخرج مثلثی شکل و نوک آن صاف است. ماده‌ها تخم‌ریز نسبتاً کوچکی دارند (Dumont, 1991).

گونه *Platynemis dealbata* (Selys & Hagen, 1850)

نرها مایل به سفید یا آبی کم رنگ بوده، لکه‌های سیاه دارند. ماده‌ها قهوه‌ای مایل به قرمز هستند. در نرها رگبال‌ها قهوه‌ای و پترواستیگما قهوه‌ای مایل به قرمز است. قطعات دهانی، لب بالا و گونه سفید مایل به سبز یا آبی براق است. پشت سر سفید مایل به سبز بوده، یک نوار سیاه روی پیشانی بین شاخک‌ها وجود دارد. یک نوار افقی سیاه پهن روی فرق و پس سر دیده می‌شود. شاخک‌ها قهوه‌ای اما پدیسل سبز مایل به سفید است. در ماده‌های جوان پترواستیگما سفید بوده، سپس به رنگ کرم و قهوه‌ای مایل به قرمز در افراد بالغ تغییر رنگ می‌دهد. لبه میانی سپر پیش سینه‌ای توسط یک فرورفتگی میانی به دو برآمدگی تقسیم شده است. از لبه جلویی یک زایده گوشتی ۷ شکل به سمت عقب رشد کرده است. ساق پاهای دوم و سوم در هر دو جنس به شکل واضحی بزرگ شده است (Dumont,

سبز زیتونی، شکم به رنگ سیاه تا سبز پوشیده شده با یک لایه گرد مانند سبز یا آبی است. ماده‌ها دارای قفس سینه زرد مایل به قهوه‌ای با نوارهای سیاه بوده، هر یک از بندهای شکم دارای یک نوار پشتی سیاه و عریض هستند که در بخش میانی توسط یک نوار زرد تقسیم می‌شوند. شکم در هر دو جنس نسبتاً باریک است.

گونه *Epallage fatime* Charpentier, 1840

در افراد این گونه بال‌ها شفاف بوده، در حاشیه نوک بال یک لکه قهوه‌ای رنگ وجود دارد. در حشرات ماده رنگ کهربایی در طول رگبال‌های اصلی در قاعده بال دیده می‌شود. ماده‌ها نسبت به نرها ساختار قوی‌تری دارند. در ماده‌های جوان، در قسمت پشتی سر فقط نواحی اطراف چشم ساده و درز بین پیشانی و فرق سر سیاه هستند. به تدریج لکه‌های سیاه توسعه می‌یابند، تا اینکه در نهایت، فقط لکه‌های زرد مجزا باقی می‌مانند. همچنین، پیش قفس سینه به جز برجستگی‌های جانبی به شکل قابل توجهی به مرور زمان تیره می‌شود. روی شکم یک نوار سیاه جانبی در طرفین و دو نوار در قسمت پشتی وجود دارد (Dumont, 1991). یک حشره ماده از این گونه از ساری جمع‌آوری شده است (شکل ۱۳). در ایران گسترش وسیع دارد و تاکنون از استان‌های تهران، خراسان، سمنان، فارس، کردستان، کرمان، کهگیلویه و بویراحمد، گلستان، گیلان و مازندران نیز گزارش شده است.

خانواده *Lestidae*

از این خانواده یک گونه شناسایی شد.

جنس *Lestes* Leach, 1815

افراد این جنس سنجاقک‌های نسبتاً کوچکی هستند. سلول دیسکوئیدال در هر دو بال عقب و جلو یک شکل است (Dumont, 1991).

مازندران و همچنین از استان‌های خراسان، خوزستان، فارس، کردستان، کرمان، گیلان و لرستان نیز گزارش شده است.

1991). اندازه بدن افراد این گونه حدود ۳/۶ سانتی‌متر است. سه حشره ماده از این گونه از شهرستان ساری جمع‌آوری شده است (شکل ۱۵). این گونه قبلاً از



شکل ۱۵- جنس ماده گونه *Platycnemis dealbata* (اصلی)



شکل ۱۴- جنس ماده گونه *Lestes virens* (اصلی)



شکل ۱۳- جنس ماده گونه *Epallage fatime* (اصلی)

سپاسگزاری

گنت بلژیک به خاطر تأیید شناسایی نمونه‌های ارسالی اعلام می‌نمایند.

نگارندگان مراتب تشکر و سپاس خود را از آقای دکتر صابر صادقی از دانشگاه شیراز به دلیل همکاری صمیمانه و آقای پروفیسور Henri J. Dumont از دانشگاه

منابع

- Dumont, H. J. (1991) Fauna Palaestina, Insecta V, Odonata of the Levant. The Israel Academy of Sciences and Humanities, Ghent.
- Ebrahimi, A., Madjdzadeh, S. M. and Mohammadian, H. (2009) Dragonflies (Odonata) from South-Eastern Iran. *Caspian Journal of Environmental Sciences* 7(2): 107-112.
- Heidari, H. and Dumont, H. J. (2002) An annotated check-list of the Odonata of Iran. *Zoology in the Middle East* 26: 133-150.
- Kiany, M. and Minaei, K. (2009) The dragonfly family Libellulidae (Insecta: Odonata: Anisoptera) of Shiraz and its Vicinity (Fars province, Iran). *Iran Agricultural Research* 27: 65-78.
- Kim, S., Oh, H., Kim, W. and Tadauchi, O. (2009) Phenetic analysis of the Anisoptera (Insecta: Odonata) in Jeju Island, Korea, based on morphological characters. *Journal of Faculty of Agriculture, Kyushu University* 54(1): 123-132.
- Sadeghi, S. (2010) An introduction to faunal study and checklist improvement of Fars province Odonata. *Taxonomy and Biosystematics* 2(5): 49-60 (in Persian).
- Sadeghi, S. and Dumont, H. J. (2004) First record of *Libellula fulvapontica* Selys, 1887 (Odonata, Anisoptera) from Iran. *Zoology in the Middle East* 32: 70-82.
- Sadeghi, S. and Mohammadalizadeh, J. (2009) Additions to the Odonata fauna of Iran. *Iranian Journal of Science and Technology* 33(4): 1-5.
- Sadeghi, S., Adriaens, D. and Dumont, H. J. (2009) Geometric morphometric analysis of wing shape variation in ten European populations of *Calopteryx splendens* (Harris, 1782) (Zygoptera: Odonata). *Odonatologica* 38(4): 343-360.

Theischinger, G. (2009) Identification guide to the Australian Odonata. Office of Environment and Heritage, Sydney.

بررسی دامنه پراکنش، تراکم و زیست‌شناسی زادآوری قرقاول بال نقره‌ای (*Phasianus colchicus principalis*, Sclater, 1885) در شمال شرق ایران

نسرین کیوانفر و منصور علی آبادیان *
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

قرقاول معمولی (*Phasianus colchicus*, Linnaeus, 1758) گونه بومی ناحیه جغرافیایی اروپا-آسیاست. زیرگونه قرقاول بال نقره‌ای (*P. c. principalis*) در ترکمنستان و شمال افغانستان تا اراضی مجاور رودخانه هریرود در شمال شرق ایران حضور دارد. پژوهش حاضر، نخستین تلاش در جهت تعیین دامنه پراکنش و میزان تراکم جمعیت‌های قرقاول بال نقره‌ای و شناخت زیست‌شناسی زادآوری آن در شمال شرق ایران است. به منظور مطالعه تراکم و پراکنش قرقاول بال نقره‌ای در دو شهرستان سرخس و درگز، ۳۶ ایستگاه تعیین شد. بررسی رفتار زادآوری این زیرگونه شامل فرآیند تخم‌گذاری، تفریح و تغذیه جوجه‌ها، با نصب دوربین و انجام فیلم‌برداری در ۱۰ ایستگاه که در آن ۱۴ آشیانه فعال پیدا شد، انجام گردید. بر اساس این مطالعه، شکل آشیانه ساده، تاریخ آغاز جوجه‌آوری در ۲۱±۵ فروردین ماه، خروج جوجه‌ها از تخم در ۱۸±۵ اردیبهشت ماه و میزان مشارکت والد نر در پرورش جوجه‌ها اندک است. طول دوره تفریح تخم‌ها در طبیعت ۲۴±۱ روز است. مقایسه ریخت‌سنجی تخم‌ها (طول و عرض)، ابعاد آشیانه و تعداد تخم در آشیانه به تفکیک در ۱۰ ایستگاه، بیانگر اختلاف معنی‌دار در جمعیت‌های مورد مطالعه است ($P < 0.05$, ANOVA). به طوری که تحلیل ممیزی و دارنگاره حاصل از صفات ریخت‌سنجی تخم‌ها، جدایی جمعیت‌ها را تأیید می‌کند. علاوه بر این، مقایسه ریخت‌سنجی تخم‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار طول تخم در حالت اسارت نسبت به طبیعت است ($P < 0.05$).

واژه‌های کلیدی: پراکنش، تولید مثل، تحلیل ممیزی، قرقاول بال نقره‌ای

مقدمه

آسیاست که به طور طبیعی از جنوب شرقی اروپا تا شرق چین و از سیبری شرقی در شمال تا هندوچین و افغانستان در جنوب گسترش یافته است. همچنین، این گونه به سایر نواحی جغرافیایی، مانند امریکای شمالی، استرالیا،

قرقاول با نام علمی *Phasianus colchicus*, Linnaeus, 1758 گونه‌ای از خانواده Galliformes (ماکیان‌ها) و بومی منطقه جغرافیای جانوری اروپا-

جنگل قاسم آباد در حاشیه رودخانه تجن در نزدیکی شهرستان سرخس و منطقه‌ای در ۳۵ کیلومتری شمال شرقی درگز (روستاهای لطف آباد و شیلگان) معرفی شده است (Scott et al., 1975؛ Mansouri, 1988).

گونه قرقاول در ایران، بر اساس قوانین شکار و صید، تحت حمایت و شکار آن ممنوع است؛ ولی در حال حاضر با توجه به تخریب‌ها و تبدیل زیستگاه‌های قرقاول و عدم مطالعه جامع و مستندات علمی لازم در ایران و آسیای مرکزی وضعیت حفاظتی این گونه، کاملاً مورد تهدید قرار گرفته، نیاز به ارزیابی جدی وضعیت حفاظتی و جایگاه آن در IUCN دارد (Braasch et al., 2011).

علاوه بر این تاکنون مطالعات اندکی درباره رفتار زادآوری این گونه انجام گرفته است. از جمله مطالعات محدود می‌توان به بررسی زادآوری و زمان انجام رفتارهای تولید مثلی زیر گونه *P. c. bianchii* در تاجیکستان (Kozłowa, 1947)، بوم‌شناسی زادآوری قرقاول، با هدف بهبود بخشیدن به مدیریت این گونه به عنوان پرنده‌ای قابل شکار (Ridley and Hill, 1987)، مطالعه ترکیبات آنزیمی تخم، نحوه تغذیه و پرورش جوجه‌های قرقاول معمولی در شرایط اسارت (Draycott et al., 2008) و همچنین مطالعات محدود مولکولی در منطقه شرق اروپا-آسیا (هندوچین) اشاره کرد (Qu et al., 2009). به طور کلی در ایران تاکنون مطالعه جامعی بر روی زادآوری این گونه صورت نگرفته است و گهگاه از این گونه به عنوان مدل برای سایر مطالعات بوم‌شناسی و آماری استفاده شده است (برای نمونه: Varasteh, 2012). بنابراین، پژوهش

نیوزیلند و غرب اروپا نیز معرفی شده است (Hill and Robertson, 1988؛ Johnsgard, 1999). پراکنش این گونه در ایران در نوار شمالی کشور از سرخس در شمال شرق تا جلفا در شمال غرب کشور است. این گونه بر اساس تغییرات صفات ریخت‌شناسی از جمله وجود حلقه سفید دور گردن، شدت رنگ آمیزی و پَر آرایشی و اندازه بدن در جنس نر، در سطح جهان دارای ۳۰ زیر گونه و در پهنه کشور ایران دارای چهار زیر گونه است. هر چند اعتبار آرایه‌شناسی بسیاری از این زیر گونه‌ها بر اساس تغییرات متنوع پَرها به چالش کشیده شده است (Madge and MacGowan, 2002). چهار زیر گونه ایران شامل: زیر گونه مازندرانی (*P. c. persicus*, Severtzov, 1875)، زیر گونه تالشی (*P. c. talischensis*, Lorenz, 1888)، زیر گونه ارسبارانی (*P. c. colchicus*, Linnaeus, 1758) و زیر گونه سرخسی (*P. c. principalis*, Sclater, 1885) است (Scott et al., 1975). سه زیر گونه مازندرانی، تالشی و ارسبارانی، در حاشیه جنوبی و غربی دریای خزر و زیر گونه سرخسی در جنوب ترکمنستان و شمال شرقی ایران و شمال غربی افغانستان پراکنده‌اند. در زیر گونه سرخسی پَرهای بال به سفید یا تقریباً سفید رنگ است که در منطقه به نام قرقاول بال نقره‌ای نامیده می‌شود. قسمت میانی سینه و کناره‌های شکم به رنگ قرمز مسی، کناره‌های سینه دارای حاشیه‌های سیاه رنگ و وسط شکم به رنگ بلوطی روشن است. زیر گونه سرخسی فاقد طوق در ناحیه گردن بوده، در صورت وجود فقط به شکل لکه‌های سفید رنگ دیده می‌شود. حد پراکنش این زیر گونه در ایران جنگل‌های سوزنی برگ جهانبانی و درخت‌زارهای گز و پده در امتداد رودخانه هریرود،

تهیه و از فعالیت زادآوری، ثبت داده‌ها انجام شد. اندازه آشیانه با خط‌کشی با دقت یک میلی‌متر و طول و عرض تخم با کولیس مدرج با دقت ۰/۱ میلی‌متر به طور مستقیم از روی تخم و لانه در محل اندازه‌گیری شد. تعداد تخم نیز در هر آشیانه شمارش گردید. میانگین صفات ریخت‌سنجی تخم‌ها با استفاده از آزمون Post Hoc با روش دانکن مقایسه گردید. علاوه بر ویژگی‌های زیستی ذکر شده در بالا، مقایسه اندازه تخم‌ها (طول و عرض تخم) در دو گروه مجزای اسارت - که توسط بومی‌ها نگهداری می‌شد - و طبیعت (۲۴: اسارت/۲۱: طبیعت) با استفاده از آزمون t مستقل (غیر جفتی) انجام گردید. تحلیل تک متغیره روی چهار صفت طول تخم، عرض تخم، اندازه لانه و تعداد تخم در آشیانه انجام شد. تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) برای بررسی صفات معنی‌دار بین ۱۰ ایستگاه مطالعه شده، تحلیل چند متغیره ممیزی بین جمعیت‌ها به منظور بررسی همزمان چهار صفت طول تخم، عرض تخم، اندازه لانه و تعداد تخم در آشیانه و بر اساس طرح آماری نوع ۲ انجام و دارنگاره ایستگاه‌ها بر اساس صفات مورد مطالعه ترسیم شد. کلیه تحلیل‌های آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد.

مشاهدات

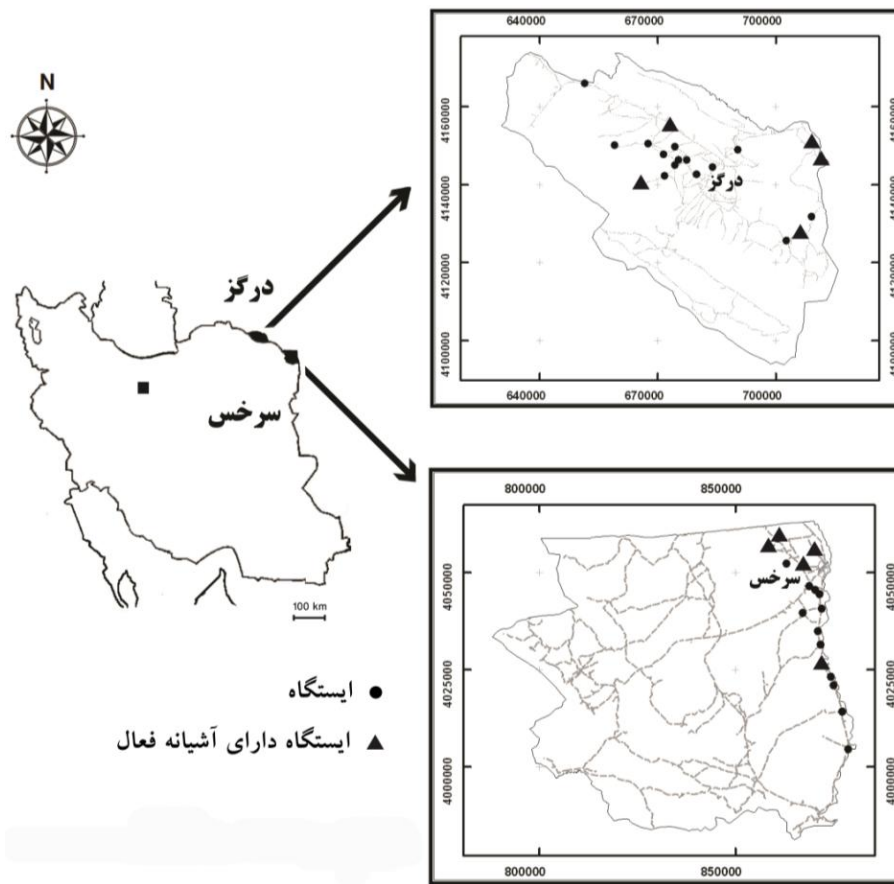
نقشه پراکنش قرقاول بال نقره‌ای به تفکیک هر شهرستان و هر ایستگاه بر اساس مشاهدات صحرایی و اطلاعات جمع‌آوری شده، تهیه گردید و سطوح متفاوت تراکم جمعیت در هر ایستگاه از تراکم پایین (بین ۳ تا ۷ قطعه)، تراکم متوسط (بین ۸ تا ۱۲ قطعه) و تراکم زیاد (۱۳ قطعه به بالا) تعیین شد (شکل‌های ۲ و ۳).

حاضر برای نخستین بار در ایران، با هدف بررسی دامنه پراکنش و تراکم این زیرگونه در شمال شرق کشور و همچنین به لحاظ اهمیت زادآوری در بقا و استقرار جمعیت‌های زیرگونه قرقاول بال نقره‌ای، به مطالعه رفتار زادآوری آن در استان خراسان رضوی پرداخته است.

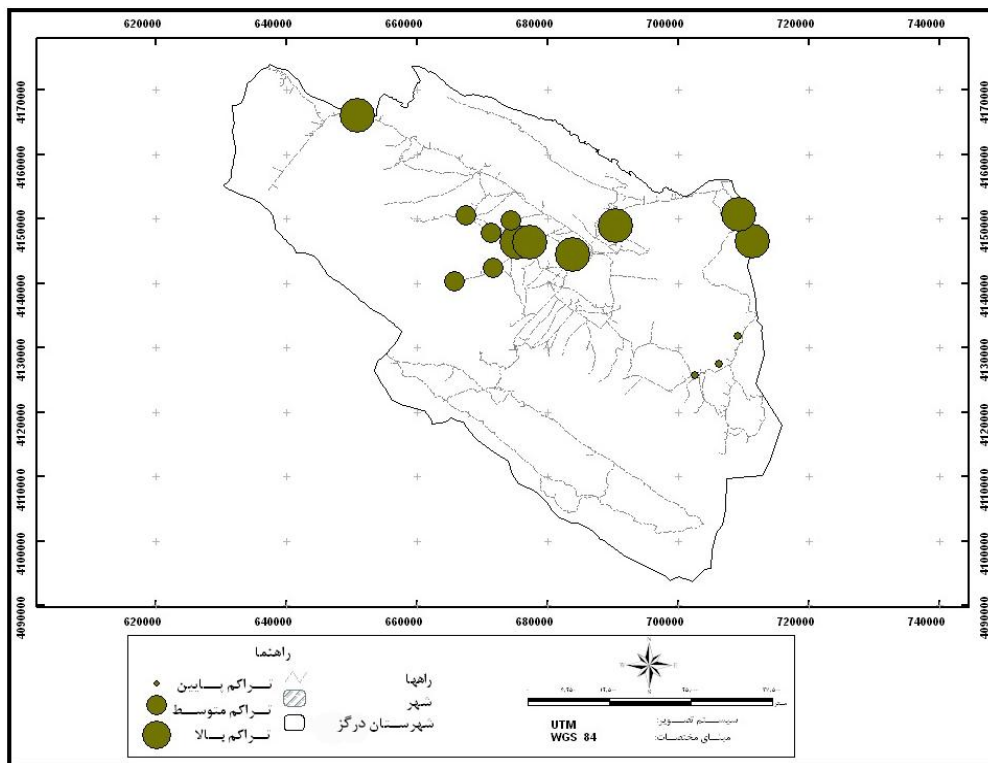
مواد و روش‌ها

کار بررسی نواحی پراکنش قرقاول بال نقره‌ای در شمال شرق کشور، در مجموع در ۳۶ ایستگاه در محدوده دو شهرستان سرخس و درگز انجام شد. نقاط حضور گونه قرقاول بر اساس اطلاعات پیمایشی - مشاهده‌ای و ۲۵۰ پرسشنامه جامعه محلی تهیه و با نرم‌افزار سامانه مختصات جغرافیایی (ArcGIS 9.3) رقمی گردید (شکل ۱).

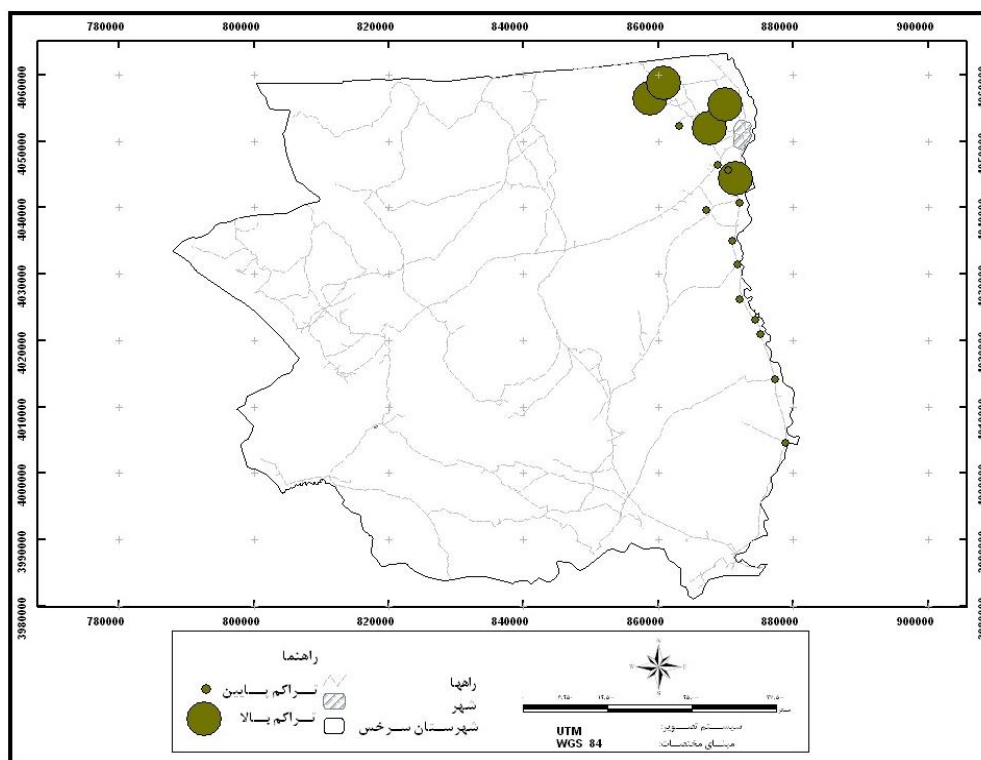
بررسی رفتار زادآوری در ۱۰ ایستگاه از ۳۶ ایستگاه که دارای آشیانه‌های فعال بودند، انجام شد. به طوری که از ۶ فروردین ماه تا ۲۸ خردادماه سال ۱۳۹۱ هر هفته به مدت سه روز در ایستگاه‌های تعیین شده با مشاهده مستقیم به جستجوی آشیانه فعال پرداخته شد. آشیانه فعال، آشیانه‌ای است که بیش از چهار تخم داشته و مادر جوجه‌کشی را آغاز نموده باشد (Gosler and Clement, 2007). سپس، از داخل کومه دست‌ساز و با استفاده از دوربین دو چشمی رفتار والدین به ویژه قرقاول ماده بررسی شد. همچنین، درون هر آشیانه تعداد دو عدد دوربین Mini CCD محصول کشور تایوان که قابلیت فیلم‌برداری در نور روز و شب را داراست، بر روی پایه نصب و از فعالیت‌های تغذیه‌ای و رفتارهای جوجه‌ها و مادر فیلم‌برداری شد. بدین ترتیب در هر نوبت پیمایش و بازدید از منطقه، تصاویر و فیلم



شکل ۱- موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری



شکل ۲- مناطق مشاهده قراول به تفکیک تراکم پایین، متوسط و بالا در شهرستان درگز



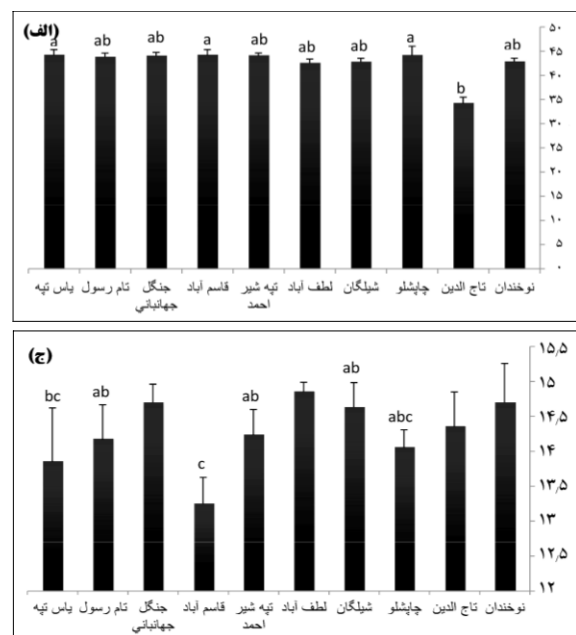
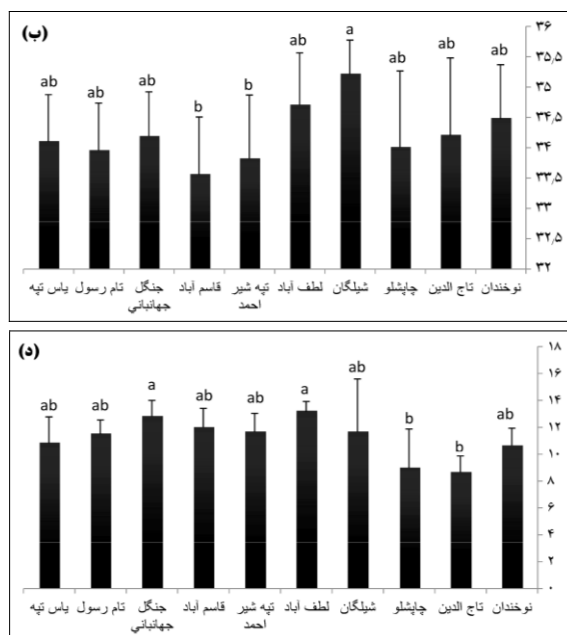
شکل ۳- مناطق مشاهده قرقاول به تفکیک تراکم پایین و بالا در سرخس

به تدریج که تعداد تخم‌ها زیادتر می‌شود و به بیش از چهار تا پنج تخم می‌رسد، با پُر کردن فضای خالی بین تخم‌ها در لانه با برگ، ساقه‌های نرم گیاهی، و پَرهای سینه‌ای، جوجه‌کشی خود را آغاز و به صورت منظم روی تخم‌ها شروع به خوابیدن می‌کند. به طور کلی، آشیانه شکل ساده‌ای داشته، با ایجاد خراش و پاکسازی سطح زمین ایجاد می‌شود. بر اساس مشاهدات این مطالعه، فرآیند لانه‌سازی و انتخاب محل لانه بر عهده مادر است و پرنده نر تلاشی برای آن نمی‌کند. تاریخ آغاز جوجه‌آوری در 21 ± 5 فروردین ماه، خروج جوجه‌ها از تخم در 18 ± 5 اردیبهشت ماه بود. به عبارت دیگر، طول دوره تفریح تخم‌ها در طبیعت، بین ۲۳ تا ۲۵ روز دیده شد، در حالی که مشاهده شد که تخم‌هایی که در شرایط آزمایشگاهی و مصنوعی و در داخل انکوباتور با دمای $37/5$ درجه نگهداری می‌شد،

نتایج بررسی رفتار تولید مثلی بر اساس بازبینی فیلم‌های ضبط شده و مشاهده مستقیم از داخل کومه نزدیک به آشیانه با استفاده از دوربین دوچشمی نشان داد که قرقاول‌های نر دارای حرمسرا هستند (تعداد یک تا سه ماده به ازای هر نر) و در طول دوره زادآوری، قلمرو طلب شده و از حرم خود دفاع می‌کنند. در دوره زادآوری قرقاول ماده در طول روز روی تخم می‌خوابد و تنها چند دقیقه (حداکثر ۱۵ دقیقه) آشیانه را برای تغذیه ترک می‌کند. از ۱۴ آشیانه فعال بررسی شده تنها در چهار آشیانه، والد نر در نزدیکی آشیانه دیده شد. در این هنگام به افرادی که به آشیانه نزدیک می‌شدند، با کوبیدن بال‌ها به یکدیگر و ایجاد صداهای هشداردهنده واکنش نشان می‌داد. همچنین مشاهدات نشان داد که قرقاول ماده تا پیش از اینکه تعداد تخم‌ها به اندازه کافی برسد (حدود چهار تخم به بالا) روی تخم‌ها نمی‌خوابد.

تخم، عرض تخم، اندازه لانه و تعداد تخم در آشیانه به تفکیک هر ایستگاه نشان داده شد (شکل ۴- الف تا د). بر اساس تفاوت معنی‌دار بین میانگین صفات ریخت‌سنجی تخم‌ها، ایستگاه‌ها به سه گروه اصلی (a, b, c) و سه گروه حد واسط (ab, bc, abc) تقسیم‌بندی می‌شوند. تحلیل آماری مذکور ابعاد آشیانه‌ها را در شش گروه (سه گروه اصلی و سه گروه حد واسط) جای می‌دهد. این در حالی است که طول تخم، عرض تخم و تعداد تخم درون آشیانه‌ها تنها در سه گروه (دو گروه اصلی و یک گروه حد واسط) قرار می‌گیرند. نتایج، گویای آن است که تغییرات در ابعاد آشیانه نسبت به طول تخم، عرض تخم و تعداد تخم درون آشیانه‌ها بیشتر است.

طول دوره تفریح تا حداکثر ۲۷ روز داشتند. قرقاول ماده در طول دوره زادآوری تا ۱۴ تخم می‌گذارد و در هر بار تخم‌گذاری که به فواصل 0.5 ± 0.32 ساعت به طول می‌انجامد، یک تخم گذاشته می‌شود. تعداد متوسط تخم در هر آشیانه برابر با ۸ تخم که کمینه آن ۴ و بیشینه آن ۱۴ تخم مشاهده گردید. نتایج این بررسی نشان داد که جوجه‌ها پس از خروج از تخم حدود هفت (0.5 ± 0.7) ساعت در لانه می‌مانند تا کاملاً خشک شوند و پس از آن همراه مادر برای تغذیه به راه می‌افتند. همچنین با مشاهده مستقیم و بازبینی فیلم‌ها، مشاهده شد که رژیم غذایی جوجه‌های تازه متولد شده را بیشتر حشرات و بی‌مهرگان تشکیل می‌دهند. نتایج حاصل از مقایسه ریخت‌سنجی اندازه طول

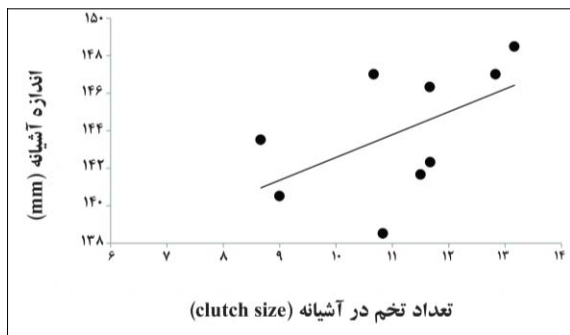


شکل ۴- گروه‌بندی متغیرهای زیست‌سنجی شده از آشیانه‌ها و تخم‌ها در مناطق ده گانه نمونه‌برداری با روش دانکن. الف) طول تخم (میلی‌متر)؛ ب) عرض تخم (میلی‌متر)؛ ج) ابعاد آشیانه (سانتی‌متر)؛ د) تعداد تخم در آشیانه (clutch size).

مقایسه اندازه تخم‌ها (طول و عرض تخم) در طبیعت و اسارت نیز با استفاده از آزمون t مستقل (غیر جفتی) بیانگر اختلاف معنی‌دار طول تخم در گروه

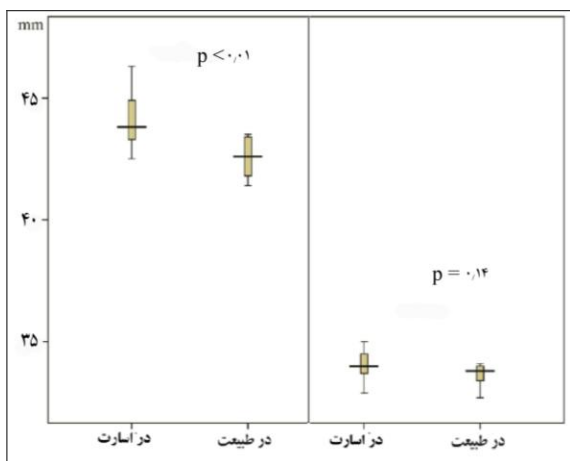
رابطه میزان همبستگی بین اندازه آشیانه و تعداد تخم در آشیانه بررسی شد که این مقدار برابر با ۲۹ درصد بود ($R^2=0.29$, $P=0.067$ و $F=3.765$) (شکل ۵).

(شکل ۸ و پیوست‌های ۱ و ۲).

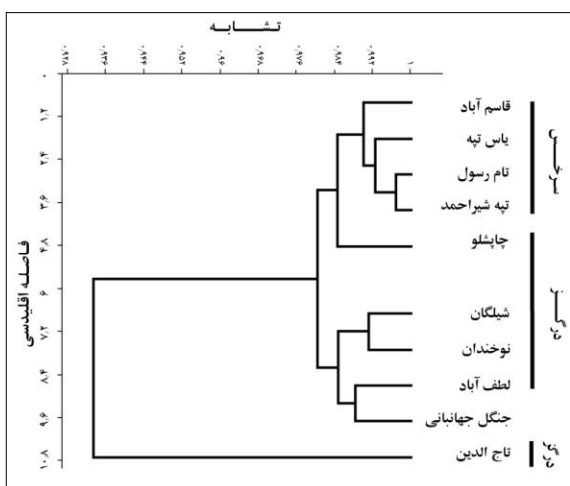


شکل ۵- رابطه تخم و اندازه آشیانه

$sig=0/067, F=0/765, R2=0/291, y=0/121x+13/04$



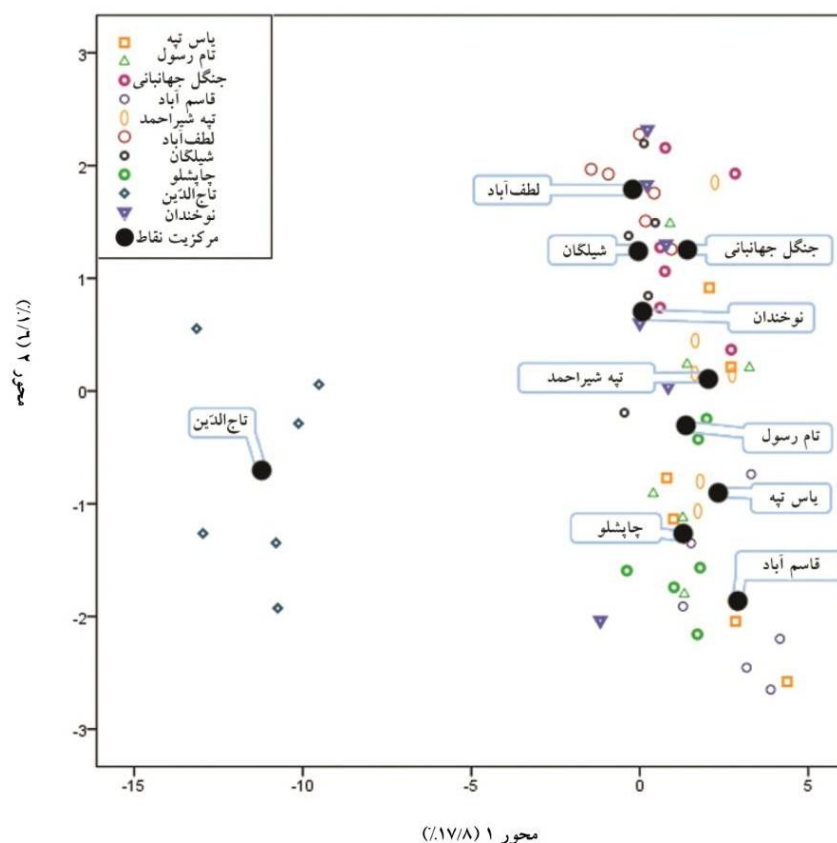
شکل ۶- مقایسه طول و عرض تخم در آسارت و طبیعت



شکل ۷- دارنگاره حاصل از متغیرهای طول تخم، عرض تخم، ابعاد آشیانه و تعداد تخم در آشیانه در ایستگاه‌های مطالعه شده

اسارت نسبت به طول تخم در گروه طبیعت (۲۴): اسارت/۲۱: طبیعت) است ($P < 0.01$) (شکل ۶). همچنین دارنگاره حاصل از صفات اندازه‌گیری شده در ۱۰ ایستگاه، علاوه بر جدایی غالب ایستگاه‌های دو شهرستان در گز و سرخس، ایستگاه تاج الدین در شهرستان در گز را در خوشه‌ای مجزا قرار می‌دهد و جنگل جهانبانی و لطف آباد در خوشه‌ای کنار یکدیگر قرار گرفتند (شکل ۷).

نتایج آنالیز واریانس ANOVA نشان داد که بین مناطق مطالعه شده در چهار صفت طول تخم، عرض تخم، تعداد تخم در آشیانه و اندازه لانه تفاوت معنی‌دار وجود دارد ($P < 0.05$). در تحلیل ممیزی، آزمون Wilk's Lambda معنی‌دار بوده، محورهای اول، دوم و سوم در مجموع ۹۹/۴ درصد واریانس را نمایش می‌دهد. مقدار ویژه محور اول برابر با ۱۷/۸۶۹ بود که ۸۹/۴ درصد از واریانس کل را توضیح می‌دهد. مقدار ویژه محور دوم ۱/۶۰۹ و ۸/۱ درصد واریانس و محور سوم مقدار ویژه ۰/۳۷۵ و ۱/۹ درصد از واریانس را به خود اختصاص دادند. از صفات بررسی شده صفت طول تخم با محور اول، صفت اندازه آشیانه با محور دوم، و صفت تعداد تخم در آشیانه با محور سوم بیشترین همبستگی را دارد. جدول مربوط به نتایج طبقه‌بندی داده‌ها (classification result) در تحلیل ممیزی داده‌های ریخت‌سنجی شده از آشیانه‌ها، با اطمینان ۴۷ درصد تعلق صحیح افراد به گروه‌های تخصیص داده شده را پذیرفته است. عدم تجانس ۱۰۰ درصدی بین تاج الدین و سایر مناطق مطالعه شده در نتایج به دست آمده، تأیید شد و بین سایر مناطق با همدیگر ۵۳ درصد تجانس وجود دارد



شکل ۸- موقعیت مناطق مطالعه شده تحلیل ممیزی داده‌های ریخت‌سنجی شده (متغیرهای طول تخم، عرض تخم، ابعاد آشیانه و تعداد تخم در آشیانه) در ایستگاه‌های نمونه‌برداری

بحث

در پژوهش حاضر، تراکم جمعیت‌های قرقاول بال نقره‌ای در شمال شرق ایران بر اساس مشاهده مستقیم و گفتگوی حضوری با مسؤلان و کارشناسان پرندنگری اداره کل محیط‌زیست در سرشماری‌های سالانه قرقاول استان خراسان رضوی، در سال‌های ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۱، برابر با ۱۰ قطعه در هر کیلومتر مربع تعیین شد. در حالی که Kozlowa در سال ۱۹۴۷ تراکم جمعیت قرقاول زیرگونه *P. c. bianchii* در تاجیکستان را ۲۰ قطعه در هر کیلومتر مربع گزارش کرده است. در شمال شرق ایران، در زیستگاه‌های قرقاول بال نقره‌ای، گیاهان اغلب از نوع گز و پده و ارقام کشاورزی هستند (Mansouri, 1988) در حالی که در تاجیکستان،

زیستگاه زیرگونه *P. c. bianchii* درختچه‌های گز، پده و گُرگ تیغ (*Lycium ruthenicus*) است (Kozlowa, 1947). نقشه‌های تراکم قرقاول بال نقره‌ای نشان می‌دهد که در مناطقی از دامنه پراکنش که زیستگاه حفاظت شده و پوشش گیاهی متراکم‌تر است، تراکم جمعیت قرقاول نیز بالاتر است. مناطقی نظیر: مزارع گندم و جو و قسمت‌هایی از باقی‌مانده جنگل‌های گز و پده. برعکس در نواحی‌ای که پوشش گیاهی تخریب شده و یا امنیت زیستگاه به مخاطره افتاده، تراکم جمعیت قرقاول پایین است. پراکنش قرقاول بال نقره‌ای احتمالاً با پراکنش آب‌های سطحی در ارتباط است، به طوری که مسیر رودخانه هریرود منطبق با مسیر پراکنش قرقاول بال نقره‌ای در سرخس است. از سوی دیگر،

قرقاوول ماده در شمال شرق ایران، $۳۲ \pm ۰/۵$ ساعت است، در حالی که Robertson در سال ۱۹۹۱ برای قرقاوول‌های انگلستان، این عدد را با اختلاف دو ساعت کمتر، $۳۰ \pm ۰/۵$ ساعت گزارش کرده است. این تفاوت می‌تواند به دلیل نوع تغذیه و تغییر عوامل محیطی باشد که مسلماً ارایه پاسخ قاطع نیازمند بررسی‌های بیشتر است.

در هر ۱۴ آشیانه فعال بررسی شده در این پژوهش، تعداد تخم‌ها در هر آشیانه بیشتر از ۴ عدد بود. به عبارتی، آغاز انکوباسیون، همزمان با گذاشتن آخرین تخم است که این یافته با نتایج بررسی جوجه‌کشی Cramp و Simmons در سال ۱۹۸۰ در قرقاوول‌های اروپا همخوانی دارد. در این حالت، احتمال ترک آشیانه توسط مادر کمتر می‌شود و به تبع آشیانه کمتر مورد تهاجم دشمنان قرار می‌گیرد. از سوی دیگر، با توجه به این که لانه قرقاوول روی زمین ساخته می‌شود، شاید بتوان این رفتار را سیاست حفظ بقا برای قرقاوول‌ها دانست. از جمله دلایل مطرح شده برای تجدید نظر جایگاه حفاظتی قرقاوول، می‌توان به این نکته اشاره کرد که تخریب زیستگاه پیامدهای ایجاد عدم امنیت و ترک لانه توسط مادر و در نتیجه عدم جوجه‌کشی کامل و کاهش تعداد زادگان قرقاوول را به دنبال دارد که به نوبه خود اهمیت بقا و زادآوری قرقاوول را خاطر نشان می‌کند. تغذیه جوجه‌های تازه تولد یافته از حشرات و بی‌مهرگان است که حاوی پروتئین بوده، برای روزهای آغازین زندگی جوجه‌ها مناسب و ضروری است (Draycott et al., 2008). از آنجا که شکل آشیانه ساده است و بر اساس چیدمان تخم‌ها مشخص می‌شود، نتایج بررسی دو شاخص اندازه آشیانه و تعداد تخم در آشیانه، حاکی از رابطه ای مثبت و ضعیف است (شکل ۵) که رابطه مستقیم بین تعداد تخم و اندازه آشیانه در قرقاوول‌ها را تأیید می‌کند (Winkler

لکه‌های متراکم جمعیت قرقاوول در منتهی‌الیه شمال شرقی کشور با اراضی جنگل جهانی در حاشیه شهرستان سرخس منطبق است که این جنگل از باقی‌مانده‌های جنگل‌های گز و پده شمال شرق است (شکل‌های ۲ و ۳). از آنجا که زیستگاه عمده قرقاوول بال نقره‌ای جنگل‌های پده و گز در حاشیه رود تجن است، تخریب این اراضی با سرعت فعلی می‌تواند تهدیدی جدی برای جمعیت‌های قرقاوول بال نقره‌ای شمال شرق محسوب شود. لذا، احیای این جنگل‌ها به عنوان ذخیره‌گاه جنگلی گز و پده برای بقای قرقاوول بال نقره‌ای امری ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر، در فصل زادآوری دما از ۴ تا ۳۳ درجه سانتیگراد متغیر بود، در حالی که در جنوب تاجیکستان کمینه دما $-۰/۵$ و بیشینه آن $+۲۳$ درجه گزارش شده است و در فصل زادآوری هیچ پوشش گیاهی در زیستگاه قرقاوول در تاجیکستان وجود نداشته است (Kozłowa, 1947). زمان آغاز زادآوری قرقاوول تاجیکستان اواخر اردیبهشت‌ماه تا نیمه دوم خردادماه است که در مقایسه با شمال شرق ایران دیرتر است. این فاصله زمانی می‌تواند به دلیل عرض جغرافیایی بالاتر تاجیکستان نسبت به شمال شرق ایران و اختلاف میانگین دمای دو منطقه و در نتیجه تفاوت شرایط بوم‌سازگان و تفاوت در زمان‌های مطالعه باشد.

در بین چهار صفت طول، عرض و تعداد تخم و ابعاد آشیانه به نظر می‌رسد در مقایسه با سایر عوامل زیستی طول، عرض و تعداد تخم به عنوان مجموعه صفات وابسته به گونه و متأثر از فیزیولوژی، از تغییرات محدودتری نسبت به ابعاد آشیانه برخوردار باشد که تحت تأثیر بوم‌سازگان تغییر می‌نماید (شکل ۴-الف تا د). میانگین فاصله زمانی بین گذاشتن تخم‌های یک

and Walters, 1983).

از طرفی، طول تخم در اسارت نسبت به طول تخم در طبیعت تفاوت معنی داری نشان می دهد. علت آن می تواند به نوع تغذیه غنی تر و مدت زمان کافی تغذیه مادر در اسارت مربوط باشد، داشتن زمان بیشتر برای تغذیه و نبود فضای مناسب برای فعالیت بدنی و راه رفتن برای جستجوی غذا را شاید بتوان از جمله عوامل مؤثر در افزایش طول تخم دانست (شکل ۶).

از آنجا که بر اساس تغذیه مادر رنگ تخم از کرمی تا سبز چرک تغییر می کند و صفت رنگ تخم دارای تغییرات در بین افراد یک جمعیت است، به عنوان صفت آرایه شناسی برای شناسایی در سطح گونه در نظر گرفته نشد (Winkler and Walters, 1983). حال آن که این صفت در سطوح فراگونه ای می تواند یک ویژگی آرایه شناسی و شاخص برای شناسایی آرایه ها باشد (Madge and McGowan, 2002).

شکست عددی شایان توجه بین مقدار ویژه محور اول با محورهای بعدی در تحلیل ممیزی نشان دهنده این واقعیت است که در بین صفات ریخت سنجی شده، طول تخم در قرقاول بال نقره ای می تواند معیار مناسبی برای جدایی جمعیت های شرق ایران در نظر گرفته شود و بیشترین سهم را در جدایی جمعیت های قرقاول شمال شرق روی محور ۱ دارد (شکل های ۷ و ۸ و پیوست ۲). به طوری که توانمندی جدا کردن جمعیت های مذکور را مورد توجه قرار می دهد. بخشی از تفاوت های معنی دار آماری ریخت سنجی تخم ها که با روش تجزیه واریانس بررسی شده بود، مشابه با تحلیل ممیزی و دارنگاره صفات، تفاوت تاج الدین با سایر ایستگاه ها را تأیید کرد. روستای تاج الدین با ارتفاع ۲۰۰۰ متر در شرق پارک ملی تندوره واقع شده است.

تاج الدین تنها ایستگاهی است که از نظر ارتفاعی از سایر ایستگاه ها متفاوت است که می تواند این فرضیه را تقویت کند که شاخص ارتفاع تأثیر به سزایی در اندازه طول تخم ها و سایر متغیرها دارد. در دارنگاره صفات، تپه شیراحمد، تام رسول و قاسم آباد که همگی به لحاظ بُعد مسافت و آب و هوا به یکدیگر نزدیک هستند در خوشه سرخس قرار می گیرند. این روستاها از توابع شهرستان سرخس با ارتفاع تقریباً ۴۰۰ متر هستند و شیلگان و نوخندان (از توابع درگز) با میانگین ارتفاع ۶۰۰ متر نیز خوشه ای دیگر در همان شاخه را تشکیل می دهد. هر چند که از لحاظ مرزبندی سیاسی جغرافیایی جنگل جهانبانی در کنار سرخس است، اما به لحاظ اقلیمی و دما، مشابه لطف آباد است و در کنار هم قرار گرفتن لطف آباد و جنگل جهانبانی می تواند به دلیل ارتفاع کم و آب و هوای نسبتاً گرم هر دو منطقه باشد که لزوم بررسی عوامل آب و هوایی در مطالعات بعدی را ضروری می نماید (شکل ۸). عوامل محیطی دیگری نیز می تواند در اندازه تخم و تعداد تخم در آشیانه و اندازه لانه مؤثر باشد که نیاز به بررسی های بیشتر در مطالعات آینده دارد. علاوه بر این می توان توصیه کرد که از مطالعات تکمیلی مولکولی جهت مطالعات زادآوری جمعیت های قرقاول بال نقره ای شمال شرق استفاده شود.

سپاسگزاری

نگارندگان از اداره کل حفاظت محیط زیست استان خراسان رضوی که امکان انجام این طرح را فراهم نمودند، سپاس ویژه دارند. از ریاست محترم اداره حفاظت محیط زیست سرخس جناب آقای مهندس محمد جواد علیپور به خاطر همکاری با گروه تحقیق سپاسگزاریم. از

مهندس رضا رضایی و خانم سحر جواهری از دانشجویان کارشناسی ارشد بیوسیستماتیک جانوری دانشگاه فردوسی مشهد که ما را در سفرها و مطالعات میدانی بی‌دریغ یاری کردند، صمیمانه سپاسگزاریم.

سرکار خانم مهندس فاطمه ظفرقاسمپور مشاور GIS و از آقای دکتر سید محمود قاسمپوری مشاور آماری مقاله، همچنین از دوستان و اعضای گروه تحقیقاتی، آقایان علی غلامحسینی، دانشجوی دکترای بیوسیستماتیک جانوری،

منابع

- Braasch, T., Pes, T., Michel, S. and Jacken, H. (2011) The subspecies of the common pheasant *Phasianus colchicus* in the wild and captivity. International Journal of Galliformes Conservation, World Pheasant Association 2: 6-13.
- Cramp, S. and Simmons, K. E. L. (1980) The birds of the Western Palearctic. vol. 2. Oxford University Press, Oxford.
- Draycott, R. A. H., Hoodless, A. N., Woodburn, M. I. A. and Sage, R. B. (2008) Nest predation of common pheasants *Phasianus colchicus*. Ibis Special Issue 150: 37-44.
- Gosler, A. and Clement, P. (2007) Family Paridae (tits and chickadees). Handbook of the Birds of the World 12: 662-750.
- Hill, D. and Robertson, P. (1988) The pheasant: ecology, management and conservation. British Standard Pipe Professional Books, Oxford.
- Johnsgard, P. A. (1999) The pheasants of the world: biology and natural history. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Kozłowa, M. (1947) On the spring life and breeding habits of the pheasant (*Phasianus colchicus*) in Tadjikistan. Ibis 89: 423-429.
- Madge, S. and McGowan, P. (2002) Pheasants, partridges and grouse: a guide to the pheasants, partridges, quails, grouse, guineafowl, buttonquails and sandgrouse of the world. Christopher Helm, London.
- Mansouri, J. (1988) Survey of state and population of common pheasant in Iran. Environmental Science Journal (in Persian).
- Qu, J., Liu, N., Bao, X. and Wang, X. (2009) Phylogeography of the ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus*) in China. Molecular Phylogenetic Evolution 52: 125-132.
- Ridley, M. and Hill, A. D. (1987) Social organization in the pheasant (*Phasianus colchicus*): harem formation, mate selection and the role of mate guarding. Journal of Zoology 211: 619-630.
- Robertson, P. (1991) Estimating the nesting success and productivity of British pheasants *Phasianus colchicus* from nest-record schemes. Bird Study 38: 73-79.
- Scott, D. A., Hamadani, H. M. and Mirhosseini, A. A. (1975) The birds of Iran. Iran Department of Environment, Tehran (in Persian).
- Varasteh, M. H. (2012) The feasibility of using distance sampling method to estimate Pheasant (*Phasianus colchicus*) population in Sa'ad Abad Forest, Gorgan. Journal of Natural Environment, Iranian Journal of Natural Resources 65(2): 259-270 (in Persian).
- Winkler, D. W. and Walters, J. R. (1983) The determination of clutch size in precocial birds. Current Ornithology 1: 33-68.

پیوست ۲ - ماتریس ساختار تحلیل ممیزی

توابع				
۴	۳	۲	۱	
-۰/۰۱۰	-۰/۵۶۷	*۰/۸۲۰	-۰/۰۷۲	ابعاد آشیانه
-۰/۶۴۱	۰/۶۷۳*	۰/۳۵۴	۰/۱۰۵	تعداد تخم
۰/۲۰۹	-۰/۱۰۵	۰/۳۵۲	*۰/۹۰۶	طول تخم
۰/۸۱۲	۰/۵۲۹	۰/۲۴۲	۰/۰۴۶	عرض تخم

پیوست ۱ - مقادیر ویژه و درصد واریانس تجزیه تحلیل ممیزی

تابع	مقدار ویژه	درصد واریانس	درصد تجمع	همبستگی کانونی
۱	۱۷/۸۶۹	۸۹/۴	۸۹/۴	۰/۹۷۳
۲	۱/۶۰۹	۸/۱	۹۷/۵	۰/۷۸۵
۳	۰/۳۷۵	۱/۹	۹۹/۴	۰/۵۲۲
۴	۰/۱۲۹	۰/۶	۱۰۰	۰/۳۳۸

بررسی گونه‌های *Sargassum* از بخش‌های *Malacocarpiceae* و *Acanthocarpiceae* (Phaeophyceae و Sargassaceae) در سواحل جنوبی ایران

معصومه شمس، سعید افشارزاده * و غلامرضا بلالی دهکردی
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

جنس *Sargassum* C. Agardh از خانواده Sargassaceae از رده جلبک‌های قهوه‌ای (Pheophyceae) است که با تراکمی بالا در مناطق زیر جزر و مدی سواحل جنوبی ایران یافت می‌شود. در پژوهش حاضر، مشخصات چهار گونه *Sargassum* متعلق به بخش‌های Acanthocarpiceae شامل: *S. oligocystum* و *S. crassifolium* J. Agardh و گونه‌های *S. henslowianum* C. Agardh و *S. bacularia* (Mertens) C. Agardh متعلق به بخشه Malacocarpiceae بررسی شد. گونه‌های بخشه Malacocarpiceae دارای رسپتاکل‌های صاف و بخشه Acanthocarpiceae دارای رسپتاکل‌های خاردار هستند. همچنین، وجود هولدفست قرصی تا مخروطی، برگ‌های نیزه‌ای کشیده با حاشیه موج‌دار تا دنداندار از ویژگی‌های برجسته این بخشه‌هاست. *S. bacularia* دارای ساقه اندکی خاردار است که به خوبی از سایر گونه‌ها متمایز می‌شود. گونه‌های *S. crassifolium* و *S. oligocystum* با ویژگی‌های انشعابات اولیه مسطح، حاشیه برگ‌های دنداندار تا مضاعف و وزیکول‌های دارای نوک براکته‌ای و رسپتاکل‌های گرز تا خوشه‌مانند شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی: تاکسونومی، سواحل جنوبی ایران، ریخت‌شناسی، *Sargassum*

مقدمه

دلیل تغییر صفات ریخت‌شناسی مختلف، متناسب با نوع زیستگاه، سن و فصل رویش امری پیچیده است (Kilar *et al.*, 1992). علیرغم اهمیت بوم‌شناختی این جنس، بررسی‌های تاکسونومی دقیق بر روی گونه‌های آن کمتر صورت گرفته است (Yoshida, 1988). اعضای بخشه Malacocarpiceae از زیرجنس *Sargassum* به واسطه رسپتاکل‌های (اندام‌های جنسی) استوانه‌ای و صاف و بخشه

سواحل جنوبی ایران مساحتی حدود ۱۲۶۰ کیلومتر در امتداد خلیج فارس و دریای عمان دارد. جنس *Sargassum* با بیش از ۴۰۰ گونه از مهم‌ترین جلبک‌های قهوه‌ای است که پراکنش وسیعی در مناطق گرمسیری تا نیمه گرمسیری دارد (Phillips, 1995؛ Tseng and Lu, 1995). شناسایی تاکسونومی گونه‌های *Sargassum* به

سیستان و بلوچستان، بندر لنگه و جزیره قشم از سال ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۱ از ناحیه زیر جزر و مدی (بر اساس سایت iranhydrography.org) انجام شد. برای بررسی دقیق ویژگی های ریخت شناسی، پس از شستشوی کامل گل و لای و اپی فیت ها، نمونه ها در فرمالین ۴ درصد تثبیت و به آزمایشگاه منتقل شدند. بررسی های تاکسونومی و ریخت شناسی با استریومیکروسکوپ Zeiss مدل -2000 C و سپس عکس برداری از نمونه ها انجام شد. برای تشخیص صحیح گونه ها، برش عرضی رسپتاکل ها به صورت دستی تهیه شد. مقاطع به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم ۴ درصد قرار داده شدند. پس از خارج نمودن مقاطع از محلول، با آب مقطر شسته، به مدت ۲ دقیقه در محلول آیلین بلو قرار داده سپس، با آب مقطر شسته شدند. تاکسونومی گونه ها با استفاده از صفات ریخت شناسی نظیر: شکل هولدفست (گیره)، شکل ساقه و انشعابات، حاشیه و نوک برگ ها، شکل وزیکول ها و پایه آن و رسپتاکل ها توسط کلیدهای شناسایی معتبر (Agardh, 1820; Agardh, 1889; Tseng, 1983; Børgeson, 1934; Grunow, 1916; De Clerck and Noro et al., 1994; Trono, 1992; Coppejans, 1996; Abdel-Kareem, 2009) انجام شد که در مجموع، چهار گونه متعلق به دو بخشه Acanthocarpiceae و Malacocarpiceae شناسایی شدند. نمونه های جمع آوری شده در هرباریوم دانشگاه اصفهان نگهداری شدند. برای اطمینان از صحت شناسایی گونه ها، تمامی نمونه ها با گونه های موجود در هرباریوم دانشگاه گنت کشور بلژیک مقایسه و به تأیید پروفیسور De Clerck رسید. همچنین، با نمونه هایی از ژاپن، مکزیک و استرالیا (موجود در هرباریوم گنت) مقایسه شد.

Acanthocarpiceae با رسپتاکل های پهن و خاردار از یکدیگر متمایز می شوند. گونه های مختلف *Sargassum* منابع مهمی از نظر آلژینیک اسید، آلژینات، فوکوئیدان های سولفات، استرول و مانیتول هستند. همچنین، برخی از گونه های آن دارای ویژگی های ضد توموری (Yamamoto et al., 1984) و فعالیت های سمّی سلولی هستند (Steven, 2001). سواحل جنوبی ایران منبع غنی از جلبک های دریایی است که نخستین گزارش درباره آنها توسط Endlicher و Diesing (۱۸۴۵) با معرفی شش گونه جلبک قهوه ای از سواحل خارک صورت گرفت. Børgeson در سال ۱۹۳۹، ۲۶ گونه جلبک قهوه ای و Nizamuddin و Gessner (۱۹۷۰) ۶۸ گونه جلبک ماکروسکوپی را از سواحل جنوبی ایران گزارش نمودند. Rabii و Sohrabipour (۱۹۹۶)، ۶ گونه در سواحل استان هرمزگان، Gharanjik (۲۰۰۵)، ۷ گونه در سواحل استان سیستان و بلوچستان و Alavian و همکاران (۲۰۰۲) ۵ گونه از جنس *Sargassum* را در سواحل کیش گزارش کردند. همچنین، Rohani و همکاران (۲۰۰۷) و Dadolahi و همکاران (۲۰۱۲) در سواحل بندر لنگه و بوشهر تنها به معرفی سیستماتیکی در حد جنس به آن اشاره نموده اند. به تازگی Shams و همکاران (۲۰۱۳)، ۱۹ گونه را در سواحل خلیج فارس و دریای عمان گزارش نموده اند. در این پژوهش، با توجه به اهمیت بوم شناختی و اقتصادی گونه های *Sargassum* به بررسی گونه های دو بخشه مهم زیرجنس *Sargassum* شامل Malacocarpiceae و Acanthocarpiceae پرداخته شده است.

مواد و روش ها

نمونه برداری از جنس *Sargassum* از سواحل استان

نتایج

بخش Acanthocarpiceae

توصیف ریخت‌شناسی گونه *Sargassum crassifolium* J. Agardh 1848: 326 (شکل ۱):

(روزنه‌ها) کوچک و اغلب نامشخص در هر دو طرف رگبرگ اصلی پراکنده‌اند. وزیکول‌ها روی انشعابات فرعی در کنار پهنک‌ها و رسپتاکل‌ها بوده، به شکل‌های کروی تا بیضوی، اغلب با منقار یا نوک براکته‌ای در رأس دیده می‌شوند. طول وزیکول‌ها ۵ و عرض آن ۰/۵-۳ میلی‌متر و نسبت طول به عرض آن ۲/۵ میلی‌متر است. پایه وزیکول‌ها پهن تا براکته‌ای، هم اندازه یا کوتاه‌تر از وزیکول‌ها (طول پایه ۲ میلی‌متر) اندازه‌گیری شد. بر روی وزیکول‌ها کریپتواستومات و در حاشیه اکثر آنها دندان‌های ریز دیده شد. گونه‌ها تک پایه، رسپتاکل‌ها استوانه‌ای با حاشیه صاف تا دندان‌دار، ساده تا منشعب مشاهده شدند. طول رسپتاکل‌ها ۱-۳ و عرض آنها ۰/۳ میلی‌متر و رسپتاکل‌ها با آرایش خوشه‌مانند در کنار برگ‌ها و وزیکول‌ها قرار گرفته‌اند.

هولوטיפ جنس: *S. bacciferum* (Turner) C. Agardh

مترادف: *S. aquifolium* (Turner) C. Agardh

تال‌ها به طول ۳۵ سانتی‌متر، به رنگ قهوه‌ای تیره تا روشن با هولدفست قرصی به قطر ۳ میلی‌متر مشاهده شدند. محور اصلی و انشعابات آن مسطح و صاف و ضخامت محور اصلی یک میلی‌متر اندازه‌گیری شد. پهنک‌ها چرمی، نیزه‌ای پهن تا کشیده با حاشیه دندان‌دار تا مضاعف مشاهده گردید. رأس برگ‌ها گرد و گاهی مضاعف و قاعده برگ‌ها نامتقارن تا گوه‌ای با دم‌برگ کوتاه مشاهده گردید. طول پهنک‌ها ۱/۵-۳ سانتی‌متر و عرض آن ۰/۵-۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

نسبت طول به عرض پهنک‌ها در قسمت‌های فوقانی، میانی و تحتانی تال به ترتیب: ۳۰، ۲۴ و ۱۲ میلی‌متر بود. رگبرگ اصلی نامشخص و تنها در قسمت قاعده برگ دیده می‌شود. کریپتواستومات‌ها



شکل ۱- *Sargassum crassifolium*: (a) شکل کلی تال جلبک؛ (b) ساختار انواع برگ‌ها؛ (c) ساختار وزیکول‌ها؛ (d) ساختار رسپتاکل؛ (e) برش عرضی رسپتاکل (scale bar: a=3 cm, b, c, d=5mm).

توصیف ریخت‌شناسی گونه *Sargassum oligocystum* Montagne 1845 (شکل ۲):

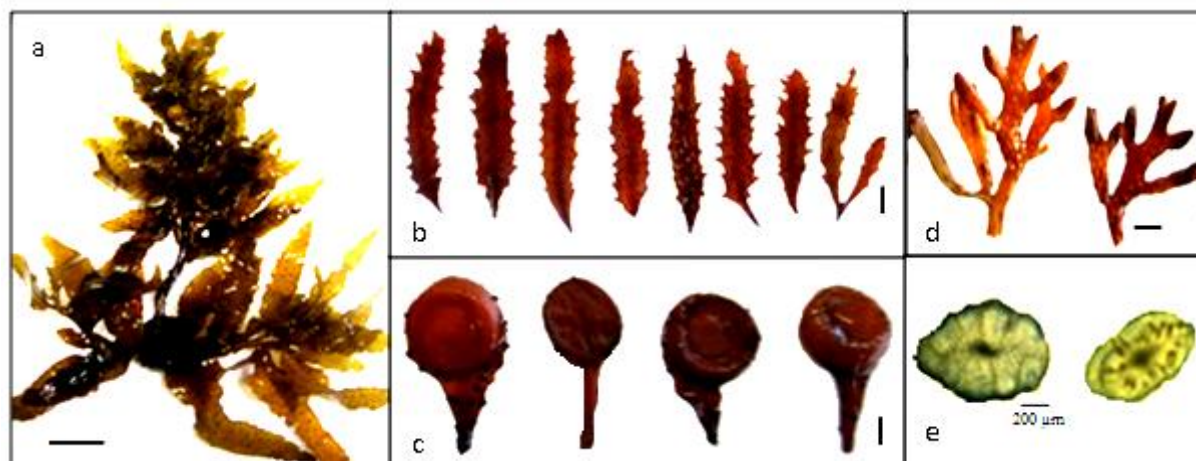
اصلی مشخص، کریپتواستومات‌ها بزرگ و مشخص در دو طرف رگبرگ اصلی پراکنده‌اند. قاعده برگ‌ها نامتقارن و دم‌برگ کوتاه وجود دارد. وزیکول‌ها روی انشعابات فرعی در کنار پهنک‌ها از نظر اندازه متغیرند و به شکل کروی تا بیضوی یا تخم‌مرغی، بدون نوک یا به ندرت نوک‌دار دیده شدند. طول وزیکول‌ها ۴-۶ و عرض آنها ۳-۵/۲ میلی‌متر و نسبت طول به عرض آن ۱/۲۱ میلی‌متر بود. پایه وزیکول‌ها گوه‌ای ساده و طول پایه ۶ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. کریپتواستومات‌ها روی پایه وزیکول و خود وزیکول‌ها به صورت نامنظم وجود دارند. گونه‌ها تک پایه، رسپتاکل‌ها به صورت نر و ماده (اندروژینوس) به طول ۹ و عرض ۳ میلی‌متر، زگیل‌دار یا با خارهای اندکی در حاشیه دیده شدند. رسپتاکل‌ها هم به صورت ساده و هم منشعب وجود داشتند.

هولوטיפ جنس: *S. bacciferum* (Turner) C. Agardh

مترادف: *Carpacanthus oligocystus* (Montagne)

Kutzing 1849

اندازه تال ۱۷ تا ۳۵ سانتی‌متر و رنگ تال قهوه‌ای تیره تا روشن مشاهده شد. این جنس دارای هولدفست مخروطی و پهن به قطر ۳ میلی‌متر است. محور اصلی و انشعابات آن مسطح و فشرده و ضخامت محور اصلی ۳ میلی‌متر و انشعابات ثانویه به صورت متناوب روی انشعابات اولیه قرار گرفته‌اند. پهنک‌ها تخم‌مرغی پهن تا کشیده، حاشیه برگ‌ها دندان‌دار با دندان‌های بزرگ و نامنظم مشاهده شد. رأس برگ‌ها گرد و دندان‌دار بود. طول پهنک‌ها ۵-۸ سانتی‌متر و عرض آن ۳-۱۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. نسبت طول به عرض پهنک‌ها در قسمت‌های فوقانی، میانی و تحتانی تال به ترتیب: ۱۲، ۶/۴ و ۵/۴۶ میلی‌متر بود. رگبرگ



شکل ۲- *Sargassum oligocystum*: (a) شکل کلی تال جلبک؛ (b) ساختار برگ‌ها؛ (c) ساختار وزیکول‌ها؛ (d) ساختار رسپتاکل؛ (e) برش عرضی رسپتاکل (scale bar: a=3 cm, b, c, d=5mm).

بخشه Malacocarpiceae

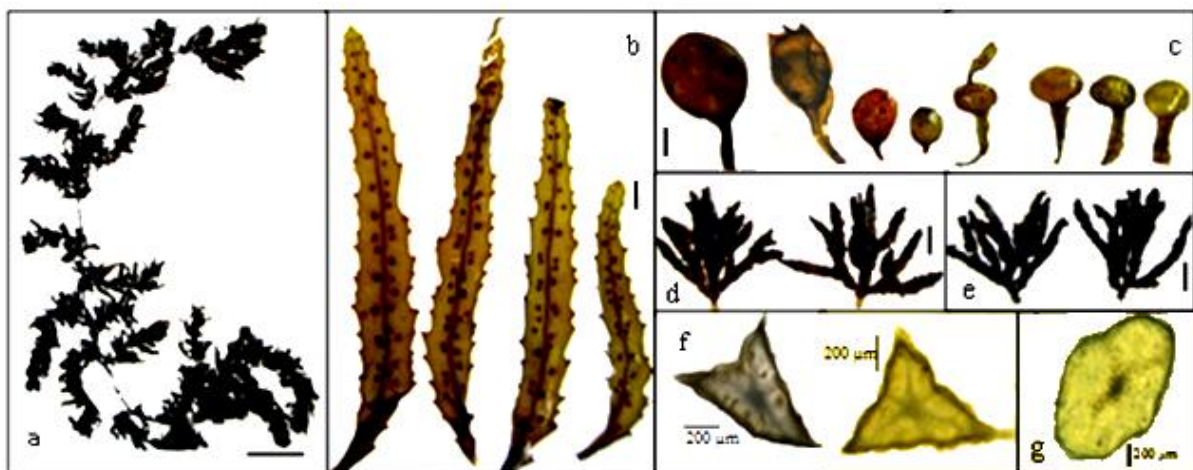
توصیف ریخت‌شناسی گونه *Sargassum baccharia* (Mertens) C. Agardh 1824: 304 (شکل ۳):

تحتانی تال به ترتیب: ۱۵/۲، ۱۱/۳ و ۲۳ میلی متر بود. رگبرگ اصلی باریک و مشخص و کریپتوستومات‌ها کوچک در هر دو طرف رگبرگ اصلی پراکنده‌اند. وزیکول‌ها روی انشعابات فرعی در کنار پهنک‌ها و رسپتاکل‌ها بوده، کروی تا بیضوی با رأس گرد و صاف دیده می‌شوند. اگرچه به ندرت نوک کوچکی در بعضی از گونه‌ها دیده شد. طول وزیکول‌ها ۴-۵ میلی متر و عرض آن ۴ میلی متر و نسبت طول به عرض آن یک میلی متر بود. پایه وزیکول‌ها گوه‌ای و میله‌ای هم اندازه یا اغلب، کوتاه‌تر از وزیکول‌ها (طول پایه ۱-۳ میلی متر) اندازه‌گیری شدند. گونه‌ها دو پایه، رسپتاکل‌های نر استوانه‌ای با حاشیه صاف، ساده، یک یا دو بار منشعب و رسپتاکل ماده سه گوش با حاشیه خاردار، ساده تا منشعب مشاهده شد. طول رسپتاکل‌ها ۸ میلی متر و عرض آنها ۱-۲ میلی متر و رسپتاکل‌ها با آرایش خوشه‌مانند در کنار برگ‌ها و وزیکول‌ها قرار گرفته‌اند.

هولوטיפ جنس: *S. bacciferum* (Turner) C. Agardh
Basionym (نام اصلی): *Fucus baccharia*
Mertens

سینونیم هتروتیپیک: *Fucus baccharia* Mertens
1819

تال‌ها باریک و به طول ۵۳ سانتی متر و رنگ تال قهوه‌ای روشن تا تیره مشاهده شد. این جنس دارای هولد‌فست قرصی کوچک به قطر ۲ میلی متر و دارای چندین انشعاب اولیه که به طور متناوب و مارپیچی روی انشعاب اولیه قرار گرفته است. محور اصلی و انشعابات آن استوانه‌ای و صاف به ندرت در برخی قسمت‌ها خاردار با ضخامت یک میلی متر دیده می‌شود. پهنک‌ها نیزه‌ای ساده با حاشیه صاف تا دندان‌های نامنظم و ریز مشاهده گردید. رأس برگ‌ها گرد تا تیز و قاعده برگ‌ها نامتقارن مشاهده گردید. طول پهنک‌ها ۲-۳ سانتی متر و عرض آن میلی متر ۱-۴ بود. نسبت طول به عرض پهنک‌ها در قسمت‌های فوقانی، میانی و

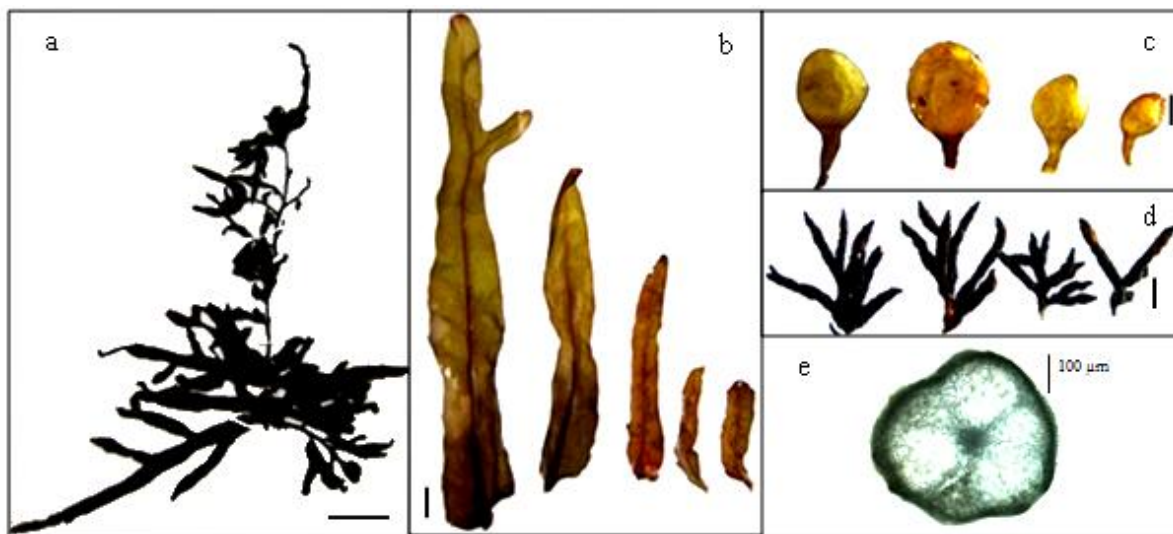


شکل ۳- *Sargassum baccharia*: (a) شکل کلی تال جلبک؛ (b) انواع برگ‌ها؛ (c) ساختار وزیکول‌ها؛ (d) ساختار رسپتاکل ماده؛ (e) ساختار رسپتاکل نر؛ (f) برش عرضی رسپتاکل ماده؛ (g) برش عرضی رسپتاکل نر (scale bar: a=3 cm, b, c, d=5mm).

توصیف ریخت‌شناسی گونه *Sargassum henslowianum* C. Agardh 1848: 315 (شکل ۴):

رگبرگ اصلی پراکنده‌اند. وزیکول‌ها روی انشعابات فرعی در کنار پهنک‌ها و رسپتاکل‌ها بوده، به شکل‌های کروی تا واژ تخم‌مرغی با نوک گرد دیده شدند. طول وزیکول‌ها ۲-۳ میلی‌متر و عرض آن ۱-۲ میلی‌متر بود. پایه وزیکول‌ها میله‌ای و مسطح، هم اندازه یا بلندتر از قطر وزیکول‌ها و گاهی دارای زواید خاردار (طول پایه ۴ میلی‌متر) مشاهده شد. در وزیکول‌ها کریستومات وجود داشت. گونه‌ها دو پایه، رسپتاکل‌های نر استوانه‌ای ساده تا منشعب، دارای زواید خارمانند در سطح و رسپتاکل ماده دوکی و کشیده هستند. طول رسپتاکل‌ها ۴ میلی‌متر و عرض آنها ۱/۵ میلی‌متر و رسپتاکل‌ها به آرایش خوشه‌مانند در کنار برگ‌ها و وزیکول‌ها قرار گرفته‌اند.

هولو تیپ جنس: *S. bacciferum* (Turner) C. Agardh
 تال‌ها به طول ۱۵-۳۰ سانتی‌متر به رنگ قهوه‌ای تیره با هولدفست قرصی پهن به قطر ۳ میلی‌متر مشاهده شدند. محور اصلی کوتاه و استوانه‌ای و دارای چندین انشعاب اولیه است. پهنک‌ها چرمی، نیزه‌ای خطی تا نیزه‌ای پهن و در قاعده به صورت ساده تا منشعب مشاهده گردید. رأس برگ‌ها گرد تا کند و تیره‌تر و قاعده برگ‌ها نامتقارن با دم‌برگ کوتاه مشاهده گردید. برگ‌های تحتانی حاشیه صاف و به ندرت موج‌دار و برگ‌های فوقانی عمدتاً مضرس واره‌ای مشاهده گردید. طول پهنک‌ها ۴-۸ سانتی‌متر و عرض آن ۱-۴ میلی‌متر بود. رگبرگ اصلی مشخص و کریستومات‌ها کوچک و نامنظم در هر دو طرف



شکل ۴- *Sargassum henslowianum*: (a) شکل کلی تال جلبک؛ (b) انواع برگ‌ها؛ (c) ساختار وزیکول‌ها؛ (d) ساختار رسپتاکل؛ (e) برش عرضی رسپتاکل (scale bar: a=3 cm, b, c, d=5mm).

رسپتاکل‌های صاف و بخشه *Acanthocarpiceae* به واسطه وجود رسپتاکل‌های خاردار از یکدیگر قابل تفکیک هستند. این گونه‌ها اغلب در ناحیه زیر جزر و مدی به ویژه در ماه‌های سرد سال مشاهده شدند و تراکم

بحث

در این پژوهش، گونه‌های دو بخشه مهم *Acanthocarpiceae* و *Malacocarpiceae* معرفی شدند. گونه‌های بخشه *Malacocarpiceae* با داشتن

که *S. oligocystum* دارای رسپتاکل‌هایی با خارهای رأسی است. در حالی که Tseng (۱۹۸۳) اظهار داشت گونه *S. oligocystum* موجود در چین دارای وزیکول‌های تخم‌مرغی تا بیضوی شکل و گاهی دارای برجستگی‌هایی در رأس هستند. همچنین، گونه *S. crassifolium* به خاطر داشتن حاشیه‌های مضاعف در برگ‌ها و وزیکول‌های دارای نوک براکته‌ای با نتایج Abdel-Kareem (۲۰۰۹) در سواحل خلیج فارس و Noiraksar و Ajisaka (۲۰۰۸) در خلیج تایلند مطابقت دارد. در این پژوهش، با بررسی دقیق ویژگی‌های ریخت‌شناسی گونه‌های دو بخش Acanthocarpiceae و Malacocarpiceae به خوبی از یکدیگر متمایز شدند و با توجه به اینکه تاکنون مطالعه تاکسونومی و سیستماتیکی روی بخش‌های این جنس صورت نگرفته بود این پژوهش گامی ارزشمند در راستای تقویت فلور و شرح تاکسونومی این جنس بسیار مهم از جلبک‌های قهوه‌ای محسوب می‌شود.

سپاسگزاری

نگارندگان از حمایت‌های مالی و علمی گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان و نیز اداره شیلات آب‌های دور چابهار، بخش اکولوژی بندر لنگه و استان بوشهر به خاطر همکاری در اجرای این تحقیق و عملیات نمونه‌برداری در استان‌های مختلف قدردانی می‌نماید. همچنین، از آقای پروفیسور Olivier De Clerck در گروه پژوهشی جلبک‌شناسی دانشگاه گنت کشور بلژیک به خاطر همکاری در تأیید و شناسایی گونه‌های *Sargassum* صمیمانه سپاسگزاریم.

بیش از حد گونه‌های *S. oligocystum* به ویژه در ناحیه بین جزر و مدی بندر لنگه باعث ایجاد کمربندی قهوه‌ای رنگ شده بود. وجود بسترهای سخت و جامد در سواحل جزر و مدی جنوبی ایران از عوامل اساسی در پراکنش و حضور گونه‌های نامبرده است. گونه *S. baccularia* با داشتن ساقه خاردار و گونه *S. crassifolium* با داشتن برگ‌هایی با حاشیه‌های دنداندار و مضاعف (دوپلیکیت) و وزیکول‌های دارای نوک براکته‌ای از سایر گونه‌ها به خوبی متمایز بودند. در گونه *S. henslowianum* از بخش Malacocarpiceae، وجود برگ‌های قاعده‌ای بزرگتر از بخش‌های فوقانی و نیز برگ‌های دو یا چند بار منشعب در قاعده، از ویژگی‌های ارزشمند برای شناسایی این گونه محسوب می‌شود. شکل رسپتاکل‌ها صفت مهمی در شناسایی *S. baccularia* است و طول آنها کمتر از ۲ سانتی‌متر بود. دو گونه *S. baccularia* و *S. polycystum* با توجه به داشتن صفات مشابه فراوان به ویژه در تال‌های جوان به جای همدیگر شناسایی می‌شوند. Lu و Tseng در سال ۱۹۹۲ اظهار داشتند که انشعابات اولیه در *S. baccularia* استوانه‌ای و صاف هستند. همچنین، Trono (۱۹۹۲) مشاهده کرد که انشعابات در قاعده مسطح و به سمت بخش‌های فوقانی‌تر مدور هستند. اگرچه Ajisaka و همکارانش (۱۹۹۹) معتقدند که گاهی ممکن است در این گونه انشعابات خاردار مشاهده شود. نتایج مشاهدات گونه‌های ایران بر اساس پژوهش حاضر و مقایسه ویژگی‌های ریخت‌شناسی دقیقاً بر اساس شرح توصیفی موجود در گونه‌های مشابه در کشورهای مالزی و ژاپن مطابقت دارد. Noro و همکاران (۱۹۹۴) گزارش نمودند

منابع

- Abdel-Kareem, M. S. M. (2009) Phenetic studies and new records of *Sargassum* species (Fucales, Phaeophyceae) from the Arabian Gulf coast of Saudi Arabia. *Journal of Plant Science* 2(3): 173-181.
- Agardh, C. A. (1820) *Species algarum rite cognitae, cum Synonymis, differentiis specificis et descriptionibus succinctis. Fucoideae*, Lund, Berling.
- Agardh, J. G. (1889) *Species Sargassorum Australiae, descriptae et depositae*. *Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar* 23(3): 1-133.
- Ajisaka, T., Phang, S. M. and Yoshida, T. (1999) Preliminary report of *Sargassum* species collected from Malaysian coast. In: *Taxonomy of economic seaweeds with reference to some Pacific and Caribbean species* (Ed. Abbott, I. A.) 2: 23-42. La Jolla, California Sea Grant College, University of California, California.
- Alavian, Z., Farmohammad, S., Savari, A. and Zehzad, B. (2002) Evaluation of abundance and distribution of seaweeds in Kish coasts related to bioenvironmental pollution. *Iranian Journal of Fisheries* 3: 63-80 (in Persian).
- Børgesen, F. (1934) Some marine algae from the northern part of the Arabian Sea with remarks on their geographical distribution. *Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskab, Biologiske Meddelelser* 11(6): 1-72.
- Dadolahi, A., Garavand-Karimi, M., Riahi, H. and Pashazanoosi, H. (2012) Seasonal variations in biomass and species composition of seaweeds along the northern coasts of Persian Gulf (Bushehr province). *Journal of Earth System Science* 121: 241-250 (in English).
- De Clerck, O. and Coppejans, E. (1996) Marine algae of the Jubail Marine Wildlife Sanctuary, Saudi Arabia. In: *A marine wildlife Sanctua for the Arabian gulf. Environmental Research and Conservation Following the 1991 Gulf War Oil Spill*. NCWCD (Eds. Krupp, F. Abuzinada and Nader, L. A.) 199-289. Riyadh and Senckenberg Research Institute, Frankfurt.
- Endlicher, S. L. and Diesing, C. M. (1845) *Enumeratio algarum, quas ad oram insulae Karek, sinus Persici, legit Theodorus Kotschy*. *Botanische Zeitung* 3: 268-269.
- Gharanjik, B. M. (2005) *Determination of biomass and expansion of algae and preparation of Persian Gulf and Oman Sea algae atlas*. Fisheries Research Center, Tehran.
- Grunow, A. (1913) *Additamenta and cognitionem Sargassorum*. *Verhandlungen der Kaiserlich Königlichen Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien*.
- Kilar, J. A., Hanisak, M. D. and Yoshida, T. (1992) On the expression of phenotypic variability: Why is *Sargassum* so taxonomically difficult? In: *Taxonomy of economic seaweeds* (Ed. Abbott, I. A.) 3: 95-117. La Jolla, California Sea Grant College, University of California, California.
- Nizamuddin, M. and Gessner, F. (1970) The marine algae of the northern part of the Arabian Sea and the Persian Gulf. *Meteor, Forschung Ergebnmies Reine* 6: 1-42.
- Noiraksar, T. and Ajisaka, T. (2008) Taxonomy and distribution of *Sargassum* (Phaeophyceae) in the Gulf of Thailand. *Journal of Applied Phycology* 20: 963-977.
- Noro, T., Ajisaka, T. and Yoshida, T. (1994) Species of *Sargassum* Subgenus *Sargassum* (Fucales) with compressed primary branches. In: *Taxonomy of economic seaweeds with reference to some Pacific and Caribbean species* (Ed. Abbott, I. A.) 4: 23-31. La Jolla, California Sea Grant College, University of California, California.
- Phillips, N. (1995) Biogeography of *Sargassum* (Phaeophyta) in the Pacific basin. In: *Taxonomy of economic seaweeds with reference to some Pacific species* (Ed. Abbott, I. A.) 5: 107-144. La Jolla, California Sea Grant College, University of California, California.

- Rohani, K., Rajabi, I., Rameshi, H., Behzadi, S., Dehghani, R., Tamadoni, S. and Hossaini, M. R. (2007) Study on distribution and biomass estimation of seaweeds in Hormozgan coastal waters and some of Persian Gulf islands. *Journal of Iranian Science Fisheries* 15: 59-68 (in Persian).
- Shams, M., Afsharzadeh, S., Balali, Gh. and De Clerck, O. (2013) Revision *Sargassum* species (Fucales, Phaeophyceae) from Persian Gulf and Oman Sea (Iran) based on morphological and phylogenetical analyses. 18th National Symposium on Applied Biological Sciences, on February, Ghent University, Ghent, Belgium.
- Sohrabipour, J. and Rabii, R. (1996) A list of marine algae of seashores of Persian Gulf and Oman Sea in the Hormozgan province. *Iranian Journal of Botany* 8: 131-162 (in English).
- Steven, F. R. (2001) Cytotoxic effects against Hela cells of polysaccharides from seaweeds. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 33: 477-484.
- Trono, G., Jr. (1992) The genus *Sargassum* in the Philippines. In: *Taxonomy of economic seaweeds with reference to some Pacific and Western Atlantic species* (Ed. Abbott, I. A.) 43-94. La Jolla, California Sea Grant College, University of California, California.
- Tseng, C. K. (1983) *Common seaweeds of China*. Science Press, Beijing.
- Tseng, C. K. and Lu, B. (1992) Studies on the Malacocarpic *Sargassum* of China: II. *Racemosae* J. Agardh. In: *Taxonomy of economic seaweeds with reference to some Pacific and Western Atlantic species* (Ed. Abbott, I. A.) 3: 11-34. La Jolla, California Sea Grant College, University of California, California.
- Yamamoto, I., Takahashi, M., Suzuki, T., Seino, H. and Mori, H. (1984) Antitumor effect of seaweeds, enhancement of antitumor activity by sulfation of a crude fucoidan fraction from *Sargassum kjellmanianum*. *Japanese Journal of Experimental Medicine* 54(4): 143-151.
- Yoshida, T. (1988) Japanese and Taiwan species of *sargssum* subgenus *Sargassum*. In: *Taxonomy of economic seaweeds with reference to some Pacific and Caribbean species* (Ed. Abbott, I. A.) 2: 5-21. La Jolla, California Sea Grant College, University of California, California.

تاکسونومی عددی سرده شب‌بوی معطر وحشی (*Matthiola*, Brassicaceae) در شمال شرق ایران با استفاده از صفات ریخت‌شناسی

مژگان رشید ترانلو^۱، جمیل واعظی^{۲*}، حمید اجتهادی^۱، فرشید معماریانی^۳ و محمدرضا جوهرچی^۳
^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
^۳ گروه گیاه‌شناسی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

Matthiola یکی از سرده‌های تیره شب‌بو (Brassicaceae) است که پراکنش وسیعی در ایران به ویژه شمال شرق کشور دارد. از میان ۴۸ گونه این سرده در دنیا، تنها ۷ گونه در شمال شرق ایران انتشار دارد. شش گونه *M. farinosa*، *M. dumulosa*، *M. chorassanica*، *M. chenopodiifolia*، *M. alyssifolia* و *M. afghanica* از این منطقه جمع‌آوری شد. دو گونه *M. revoluta* و *M. flavida* برای نخستین بار از منطقه شمال شرق ایران گزارش می‌شود. یک آرایه ناشناخته (*Matthiola* sp.) نیز طی جمع‌آوری‌ها به مطالعه حاضر افزوده شد. در این بررسی سعی شده است، با استفاده از ویژگی‌های بیشتر و تعیین حد و مرزی برای دامنه صفات، کلید مناسبی برای شناسایی گونه‌های موجود در شمال شرق ایران ارائه گردد. بدین منظور، شناسایی و اندازه‌گیری ۷۱ صفت (کمی و کیفی) مربوط به ۶۸ نمونه و سپس تحلیل آماری روی داده‌ها انجام شد. نتایج حاصل از تحلیل تک متغیره نشان داد که صفاتی نظیر وجود کُرک روی ساقه و برگ و همچنین وجود کُرک غده‌ای روی کاسبرگ و پایک خورجین اختلاف معنی‌داری را نشان نداد، از ماتریکس صفات حذف شدند. همچنین، این نتایج نشان داد که گونه‌های مطالعه شده در سه گروه قرار می‌گیرند. گروه اول شامل نمونه‌های گونه *M. alyssifolia*، گروه دوم شامل گونه‌های *Matthiola* sp.، *M. afghanica*، *M. chenopodiifolia*، *M. dumulosa*، *M. farinosa* و *M. flavida* و آرایه ناشناخته *Matthiola* sp. و گروه سوم شامل نمونه‌های دو گونه *M. revoluta* و *M. chorassanica* می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تیره شب‌بو (Brassicaceae)، ریخت‌شناسی، شمال شرق ایران، *Matthiola*

مقدمه

(tetradynamous) و میوه خورجین یا خورجینک، از سایر تیره‌ها متمایز می‌شوند (Rechinger, 1982). این تیره در بیشتر نقاط جهان به ویژه در مناطق معتدل

گیاهان تیره شب‌بو (Brassicaceae) همواره از طریق نافه گلی با دو پرچم کوتاه و چهار پرچم بلند

(2006). در این سرده، گونه‌ها علفی یک‌ساله و یا چند ساله، گُرک‌ها به صورت غیر غده‌ای پایه‌دار و یا چسبیده، ستاره‌ای و یا دندان‌های، گل آذین خوشه بدون برگه، گلبرگ‌ها به رنگ‌های زرد، سفید، سبز، صورتی، بنفش یا قهوه‌ای و دارای ناخنک هستند. پرچم‌ها ۶ عدد و تترادینام، تخمک‌ها (۵-) ۱۵ تا ۶۰ عدد در هر تخمدان و میوه شکوفای خطی است (Ghahreman, 1994). این سرده دارای ۴۸ گونه در دنیا است و پراکنش وسیعی دارد، به طوری که در ماکرونزی و مناطق مدیترانه، صحرا-سندی و آسیا-افریقا گسترش داشته و دو مرکز تنوع تاکسونومیکی را در منطقه ترکیه و ایرانی-تورانی نشان می‌دهد (Warwick et al., 2006؛ Al-Shehbaz et al., 2006). (Rechinger, 1982)، ۱۷ گونه از این سرده در محدوده فلورا ایرانیکا قرار دارد که فقط ۱۰ گونه از آن در ایران انتشار دارند. این سرده پراکنش وسیعی در ایران به ویژه در استانهای آذربایجان، اصفهان، فارس، همدان و شمال شرق ایران دارد. از میان این ۱۰ گونه، تعداد ۷ گونه شامل: *M. alyssifolia* M. *afghanica* Rech. f. & Koeie *M. chenopodiifolia* Fisch. & C. (DC.) Bornm. *M. chorassanica* Bge. ex Boiss. A. Mey. *M. farinosa* M. *dumulosa* Boiss. & Buhse *M. ovatifolia* (Boiss.) Boiss. و Bge. ex Boiss. در شمال شرق ایران پراکنش دارند. در این مطالعه، نمونه‌های متعلق به شمال شرق ایران بررسی شده است. در کلیدی که در فلورا ایرانیکا برای این سرده ارائه شده است (Rechinger, 1982) چندین صفت از جمله، برآمدگی رأس خورجین، طول و عرض خورجین، چوبی بودن بخش قاعده‌ای گیاه، طول

نیمکره شمالی به فراوانی یافت می‌شود (Al-Shehbaz, 1984). مرکز عمده پراکنش این تیره مناطق مدیترانه‌ای، ایرانی-تورانی و صحرا-سندی است (Hedge, 1976). Schulz و همکاران (۱۹۳۶) در بررسی این تیره، ۳۶ سرده را در سطح جهان معرفی کردند و بر اساس تعدادی از صفات از جمله غدد شهدی، موقعیت لپه‌ها نسبت به ریشه‌چه و طول میوه، آنها را در ۱۹ قبیله طبقه‌بندی نمودند. Janchen (۱۹۴۲) قبیله‌های طبقه‌بندی Schulz و همکاران (۱۹۳۶) را از ۱۹ به ۱۵ کاهش داد. وی دو قبیله *Hesperideae* و *Matthioleae* را در هم ادغام و در قبیله *Hesperideae* قرار داد، زیرا صفت جنین انکومبنت (incumbent) در قبیله *Hesperideae* در مقابل اکومبنت (accumbent) قبیله *Matthioleae* برای جدا کردن دو قبیله، تعیین کننده نبود. این تیره در جهان از ۳۳۸ سرده و تقریباً ۳۷۰۹ گونه تشکیل شده است (Al-Shehbaz et al., 2006) و همکاران (۲۰۰۶) ۲۴ قبیله را در این تیره معرفی کردند. در ایران این تیره با ۱۲۰ سرده و ۳۵۸ گونه از بزرگترین تیره‌ها محسوب می‌شود (Akhani, 2003).

Matthiola R. BR. یکی از سرده‌های متعلق به تیره Brassicaceae است که در فلورا ایرانیکا (Rechinger, 1982) در قبیله *Matthioleae* قرار داده شده است، اما Al-Shehbaz و همکاران (۲۰۰۶)، این سرده را بر اساس داده‌های مولکولی، در قبیله *Anchonieae* قرار دادند. قبیله *Anchonieae* دارای گُرک‌های منشعب، کلاله دو لوبی، کاسبرگ‌های راست و عدد پایه کروموزومی $x=7$ هستند که *Matthiola* سری‌های آنیوپلوئیدی کاهشی تا $x=5$ و افزایشی تا $x=8$ را نیز نشان می‌دهد (Beilstein et al.,

به نظر می‌رسد که در کلیدها به جای استفاده از برخی ویژگی‌های کیفی مبهم مانند میزان گستردگی روی سطح زمین و یا میزان چوبی بودن ساقه گیاه، بهتر است صفات کمی مطرح شود که دارای تباین کافی نیز باشند. به هر حال، در شرح گونه‌های ارایه شده، دامنه‌هایی که برای صفات کمی بیان شده، بین گونه‌ها همپوشانی بالایی دارند. برای مثال، طول خورجین در تمامی گونه‌های شمال شرق ایران یعنی در *M. afghanica* (۸-۱۰ سانتی‌متر)، *M. alyssifolia* (۱۰-۱۲)، *M. chenopodiifolia* (۶-۹)، *M. dumulosa* (۵-۷)، *M. chorassanica* (۶-۱۰) و *M. farinosa* (۶-۱۴) همپوشانی نشان می‌دهد. از دیگر صفات ریخت‌شناسی که در کلیدها به فراوانی به کار رفته، اما در شناسایی‌ها نمی‌تواند راه‌گشا باشد، تراکم گره‌ها و انواع غده‌ای و غیر غده‌ای آن است. از آنجا که این صفات تحت تأثیر محیط (ارتفاع، میزان رطوبت و ...) است (Pigliucci, 1997؛ Gianoli and González-Teuber, 2005)، تراکم آن می‌تواند گمراه‌کننده باشد. از سوی دیگر، مقادیر کمی این صفات بین افراد یک گونه نیز از ثبات کافی برخوردار نیست، به ویژه گره‌ها که تنوع بسیار بالایی را نشان می‌دهد. برای نمونه در کلید شناسایی فلورا ایرانیکا (Rechinger, 1982) اشاره شده است که گونه *M. alyssifolia* گیاهی با ساقه صاف و بدون گره است، اما نمونه‌های پوشیده از گره آن نیز دیده شده است (همین مطالعه). در بررسی حاضر سعی شده است تا با استفاده از صفات ریخت‌شناسی کمی و کیفی (روش ریخت‌سنجی (morphometric))، گونه‌های این سرده را در شمال شرق ایران از یکدیگر متمایز و کلید شناسایی مناسبی برای شناسایی و تفکیک گونه‌های این سرده در منطقه مورد مطالعه ارایه گردد. Otieno و همکاران

دمگل و منقسم بودن برگ تعیین‌کننده و متمایزکننده گونه‌ها هستند. این صفات در تمام موارد به راحتی قابل استفاده نبوده، در مواقعی، ابهاماتی را در کاربرد کلید شناسایی ایجاد می‌نماید. برای نمونه در گونه *M. farinosa*، در یک فرد، انواع برگ از برگ کامل تا برگ‌هایی با حاشیه دندانه‌ای درشت یا لوب‌دار را می‌توان دید، و یا در گونه *M. revolute* Bge. ex Boiss. طبق کلید، طول برگ‌ها باید حداکثر ۲۰ میلی‌متر باشد، اما در برخی از افراد برگ‌هایی با طول بیش از ۲۰ میلی‌متر نیز دیده می‌شود. در بخشی از کلید که دو گونه *M. chorassanica* و *M. flavida* Boiss. را از سه گونه *M. afghanica*، *M. dumulosa* و *M. farinosa* تنها با صفت عرض خورجین از یکدیگر جدا می‌کند، دامنه عرضی که برای خورجین ارایه شده است، بسیار نزدیک است و گاهی افراد متعلق به یک گونه از این دامنه تبعیت نمی‌کنند. در برخی از قسمت‌های کلید، صفاتی بیان شده است که بر اساس اینکه یک پژوهشگر چه برداشتی از آن صفت داشته باشد، ممکن است مسیر شناسایی را به اشتباه دنبال کند. برای مثال، در جایی که دو گونه *M. afghanica* و *M. dumulosa* از یکدیگر جدا می‌شوند، از صفات قاعده گیاه "کاملاً چوبی" و "کمی چوبی" و یا "ساقه با گل‌های متعدد" و "ساقه با تعداد کمی گل"، استفاده شده، که تفکیک بین این دو گونه را با مشکل مواجه می‌سازد. همچنین، در برخی از قسمت‌های کلید شناسایی، به "رنگ پوشش گره‌کی" اشاره شده است، اما از آنجا که عمده شناسایی‌ها بر روی گیاهانی انجام می‌شود که پرس شده و احتمال تغییر رنگ اجزای آنها وجود دارد، در مجموع، شناسایی را با شبهه همراه می‌سازد.

فلور پاکستان (Jafri, 1973)، فلور ترکیه (Davis, 1965)، فلور چین (Taiyan et al., 2001) و فلور شرق (Boissier, 1975) شناسایی گردید. علیرغم تلاش فراوان برای جمع‌آوری گونه *M. ovatifolia* از محل گزارش شده در فلورا ایرانیکا (بین شاهرود و نیشابور) (Rechinger, 1982)، هیچ نمونه‌ای از این گونه یافت نشد. علاوه بر یافتن سایر گونه‌های گزارش شده در فلور مذکور، دو گونه *M. flavida* و *M. revoluta* نیز برای نخستین بار از منطقه مورد مطالعه جمع‌آوری و گزارش می‌شود. از سوی دیگر، طی جمع‌آوری از منطقه کاشمر، نمونه‌هایی یافت شد که شناسایی آنها با کلیدهای شناسایی موجود امکان‌پذیر نبود. این نمونه‌ها در این مطالعه با عنوان *Matthiola* sp. معرفی و موقعیت آنها در میان سایر گونه‌ها بررسی شد.

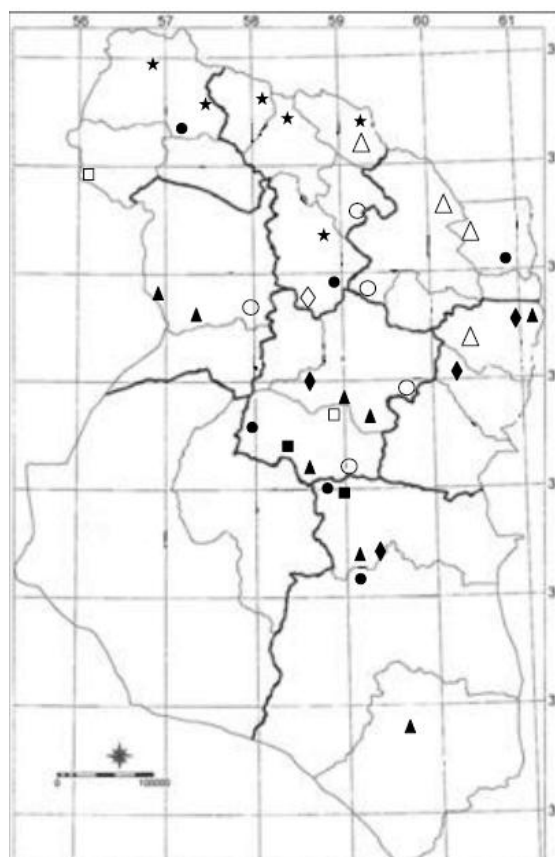
(۲۰۰۶) نشان دادند که روش ریخت‌سنجی ابزاری قوی را برای ارزیابی روابط فنتیکی بین آرایه‌هایی که به لحاظ ریخت‌شناسی قرابت دارند، فراهم می‌کند.

مواد و روش‌ها جمع‌آوری نمونه

بررسی و اندازه‌گیری صفات بر روی دو دسته از نمونه‌ها انجام شد: ۱- نمونه‌های هرباریومی موجود در هرباریوم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد (FUMH) و ۲- نمونه‌هایی که طی فصل رویشی سال ۱۳۸۹ از مناطق مختلف شمال شرق ایران جمع‌آوری شده بود (شکل ۱ و جدول ۱). نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از کلیدهای شناسایی: فلورا ایرانیکا (Rechinger, 1982)، فلور شوروی (Chernyakhovskaya, 1965)،

شکل ۱- نقشه پراکنش نمونه‌های جمع‌آوری شده گونه‌های جنس *Matthiola* در سه استان خراسان رضوی، شمالی و جنوبی.

- Matthiola* sp. :◇
- M. afghanica* :○
- M. alyssifolia* :●
- M. chenopodiifolia* :▲
- M. chorassanica* :□
- M. dumulosa* :◆
- M. farinosa* :★
- M. flavida* :△
- M. revoluta* :■



جدول ۱- نمونه‌های جمع‌آوری شده و هرباریومی استفاده شده در مطالعه ریخت‌سنجی به همراه شماره هرباریومی، محل جمع‌آوری و جمع‌آوری‌کننده (گان). افراد مورد مطالعه متعلق به هرباریوم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد (FUMH) با ستاره مشخص شده‌اند.

کد هرباریومی	نام علمی گونه	محل جمع‌آوری	جمع‌آوری‌کننده
19991	<i>M. afghanica</i>	جاده قائن به بیرجند	بصیری
19992	<i>M. afghanica</i>	جاده قائن به بیرجند	بصیری
19994	<i>M. afghanica</i>	جاده قائن به بیرجند	بصیری
*20658	<i>M. afghanica</i>	کوه‌های رباط سفید	جوهرچی-زنگویی
*19946	<i>M. afghanica</i>	ترت حیدریه-اسکندر آباد	جوهرچی-زنگویی
*22870	<i>M. afghanica</i>	کاشمر-تاغستان نوذر	فقیه‌نیا-زنگویی
*23347	<i>M. afghanica</i>	چناران-بین آبد و فریزی	جوهرچی-زنگویی
*21656	<i>M. alyssifolia</i>	بجنورد-قلعه شیخ-سرخ زو	حجت-زنگویی
*18360	<i>M. alyssifolia</i>	کاخک-کوه‌های بین کلاته نو و پاگوار	جوهرچی-زنگویی
*31910	<i>M. alyssifolia</i>	غرب سرخس-کوه‌های غار بزنگان	رافعی-زنگویی
*10867	<i>M. alyssifolia</i>	جنوب شرقی بیرجند-کوه‌های باقران	رافعی-زنگویی
*25098	<i>M. alyssifolia</i>	غرب گناباد-فردوس به بقچیر	رافعی-زنگویی
*12345	<i>M. alyssifolia</i>	نیشابور-پیوژن	رافعی-زنگویی
*25037	<i>M. alyssifolia</i>	جاده گناباد-فردوس-کیلومتر ۲۱	رافعی-زنگویی
*25212	<i>M. alyssifolia</i>	بیرجند-بین مرک و دوراهی سرچاه	رافعی-زنگویی
*27242	<i>M. alyssifolia</i>	بجنورد-غرب گیفان	رافعی-زنگویی
*26232	<i>M. chenopodiifolia</i>	طبس-بین دو راهی دیهوک	رافعی-زنگویی
*18290	<i>M. chenopodiifolia</i>	ترت حیدریه-عمرانی-۲۵ کیلومتری گناباد	فقیه‌نیا-زنگویی
*19825	<i>M. chenopodiifolia</i>	نهبندان-جاده طبسین	جوهرچی-زنگویی
*19708	<i>M. chenopodiifolia</i>	شرق تربت جام-کوه‌های ملو	جوهرچی-زنگویی
*20190	<i>M. chenopodiifolia</i>	صافی‌آباد-فاروسی	جوهرچی-زنگویی
*22997	<i>M. chenopodiifolia</i>	گناباد-جاده سیمرخ به آهنگران	فقیه‌نیا-زنگویی
*32219	<i>M. chenopodiifolia</i>	بین تربت حیدریه و گناباد	فقیه‌نیا-زنگویی
*32436	<i>M. chenopodiifolia</i>	جنوب سبزوار-دولت آباد	فقیه‌نیا-زنگویی
*32090	<i>M. chenopodiifolia</i>	شرق قائن-بین پترگان و یزدان	جوهرچی-زنگویی
*12053	<i>M. chenopodiifolia</i>	۷ کیلومتری جنوب قائن	جوهرچی-زنگویی
17181	<i>M. chorassanica</i>	گناباد-۲ کیلومتری خضری	بصیری
17182	<i>M. chorassanica</i>	گناباد-۲ کیلومتری خضری	بصیری
*907	<i>M. chorassanica</i>	غرب جاجرم-درق-تپه‌های شنی	جوهرچی-زنگویی
1570	<i>M. dumulosa</i>	جاده قائن به بیرجند	بصیری
1571	<i>M. dumulosa</i>	جاده قائن به بیرجند	بصیری
1572	<i>M. dumulosa</i>	جاده قائن به بیرجند	بصیری
1573	<i>M. dumulosa</i>	جاده قائن به بیرجند	بصیری
*21906	<i>M. dumulosa</i>	تایباد-کوه سفید	جوهرچی-زنگویی
*19946	<i>M. dumulosa</i>	جنوب غربی تربت حیدریه	جوهرچی-زنگویی
*19709	<i>M. dumulosa</i>	شرق تربت جام-کوه‌های ملو	جوهرچی-زنگویی

کد هرباریومی	نام علمی گونه	محل جمع آوری	جمع آوری کننده
9811	<i>M. farinosa</i>	بجنورد-جاده بابامان به اسپیدان	کریمی-بصیری
7346	<i>M. farinosa</i>	درگز-علی بولاغ	طیسی
892360	<i>M. farinosa</i>	درگز-پارک ملی تندوره	واعظی-طیسی
893	<i>M. farinosa</i>	منطقه حفاظت شده حیدری	بهرامی-مختاری
1515	<i>M. farinosa</i>	درگز-علی بولاغ	واعظی-طیسی
1511	<i>M. farinosa</i>	آشخانه-درکش	رفیعی-شریعمداری
1512	<i>M. farinosa</i>	بجنورد-نرسیده به پتروشیمی	بطیاری-کریمی
1510	<i>M. farinosa</i>	بجنورد-جاده بابامان به اسپیدان	بطیاری-کریمی
1513	<i>M. farinosa</i>	شیروان-گدگانلو	رشید
1526	<i>M. farinosa</i>	قوچان-دربادام	رشید-بصیری
8923	<i>M. flavida</i>	سرخس-بزنگان	رشید
89231	<i>M. flavida</i>	سرخس-بزنگان	بصیری
89232	<i>M. flavida</i>	درگز-پارک ملی تندوره	واعظی-طیسی
89233	<i>M. flavida</i>	سرخس-بزنگان	رشید
89234	<i>M. flavida</i>	سرخس-بزنگان	رشید
89235	<i>M. flavida</i>	سرخس-بزنگان	بصیری
89236	<i>M. flavida</i>	سرخس-بزنگان	رشید
89237	<i>M. flavida</i>	پارک ملی تندوره	واعظی-طیسی
8922	<i>M. flavida</i>	سرخس-بزنگان	رشید
*19709	<i>M. flavida</i>	شرق تربت جام-کوه‌های ملو	جوهرچی-زنگویی
15221	<i>M. revoluta</i>	گناباد-سرآسیاب دامنه کوه	بصیری
15222	<i>M. revoluta</i>	گناباد-سرآسیاب دامنه کوه	بصیری
15223	<i>M. revoluta</i>	گناباد-سرآسیاب دامنه کوه	بصیری
15224	<i>M. revoluta</i>	گناباد-سرآسیاب دامنه کوه	بصیری
*8021	<i>M. revoluta</i>	گناباد-کوه‌های سمت چپ آب سنو	جوهرچی-زنگویی
*12832	<i>M. revoluta</i>	گناباد-کوه‌های سرآسیاب	جوهرچی-زنگویی
15662	<i>Matthiola</i> sp.	۶۵ کیلومتری کاشمر-کوه سرخ	رشید-بصیری
15663	<i>Matthiola</i> sp.	۶۵ کیلومتری کاشمر-کوه سرخ	رشید-بصیری
15664	<i>Matthiola</i> sp.	۶۵ کیلومتری کاشمر-کوه سرخ	رشید-بصیری
15665	<i>Matthiola</i> sp.	۶۵ کیلومتری کاشمر-کوه سرخ	رشید-بصیری
15666	<i>Matthiola</i> sp.	۶۵ کیلومتری کاشمر-کوه سرخ	رشید-بصیری
15667	<i>Matthiola</i> sp.	۶۵ کیلومتری کاشمر-کوه سرخ	رشید-بصیری

جمع آوری داده‌ها

صفات مناسب برای مطالعه ریخت‌سنجی با مطالعه شرح گونه‌های مختلف که در فلورهای ذکر شده در بخش "جمع آوری نمونه" آمده است و نیز مشاهده

نمونه‌های متعدد، فهرست‌نویسی شد (جدول ۲). صفات کمی و کیفی برای هر یک از نمونه‌های مورد مطالعه، اندازه‌گیری و مقادیر آنها در ماتریس صفات وارد گردید. پس از بررسی ۳۰۰ نمونه، تعداد ۶۸

سه برگ قاعده‌ای (از ناحیه یقه به بالا) گیاه بود. همچنین، میانگین صفات مربوط به بالغ‌ترین سه گل، سه میوه و سه دانه (معمولاً مستقر در پایین‌ترین بخش گیاه) به عنوان معیار اندازه‌گیری انتخاب شد و در مواردی (مانند فقدان بذر بالغ)، به دلیل ناقص بودن نمونه بررسی شده، برای برخی از صفات کمی، میانگین (سایر نمونه‌های همان گونه) اندازه‌گیری‌های مربوط به آن صفت جایگزین شد (Legendre and Legendre, 1998).

نمونه انتخاب و ۴۲ صفت کمی و ۳۰ صفت کیفی برای مطالعه آنها اندازه‌گیری شد (جدول ۲). در مطالعه حاضر سعی شده است تا حد امکان از نمونه‌هایی استفاده شود که تنوع ریخت‌شناسی بیشتری داشته، متعلق به جمعیت‌هایی از نواحی مختلف جغرافیایی منطقه مورد مطالعه باشند. صفات کیفی به صورت دو تایی (۰ و ۱) و یا چند تایی (۰، ۱، ۲، ۳، ...) کدگذاری شدند. صفات اندازه‌گیری و یا کدگذاری شده مربوط به برگ‌ها، شامل میانگینی از

جدول ۲- فهرست صفات کمی و کیفی بررسی شده. دامنه حالت‌های صفات کیفی استفاده شده در داخل پرانتز آمده است. اندازه‌های کمی بر حسب میلی‌متر و درجه است. صفاتی که با حرف "a" نشان داده شده‌اند، صفاتی هستند که در آزمون تک متغیره اختلاف معنی‌داری بین گونه‌ها نشان نداده و از تجزیه و تحلیل PCA حذف شده‌اند.

شماره	صفت کیفی	اختصار
۱	نوع گیاه (یک ساله: ۰ یا چند ساله: ۱)	LISP
۲	انشعابات گیاه (ساده: ۰ یا منشعب: ۱)	PLBR
۳	افراشنگی گیاه (بخش و خوابیده: ۰، نیمه افراشته: ۲ و راست: ۳)	GRFO
۴	نوع ساقه (ساده: ۱ یا منشعب: ۲)	STBD
۵	تراکم ساقه‌ها (کم: ۱، متوسط: ۲ و زیاد: ۳)	STBR
۶	تراکم کرک روی ساقه (صاف: ۰، تنک: ۱، متوسط: ۲، متراکم: ۳ و خیلی متراکم: ۴)	TDST
۷	وجود کرک غده‌ای روی ساقه (حضور: ۱، عدم حضور: ۲)	GLST a
۸	شکل نوک برگ (تیز و باریک: ۱، تیز و پهن: ۲، کند: ۳)	SLTI
۹	شکل برگ (واژ تخم‌مرغی: ۱، واژ سرنیزه‌ای: ۲، تخم‌مرغی: ۳)	LESH
۱۰	داشتن دم‌برگ (ندارد: ۰، دارد: ۱)	PETI
۱۱	وجود کرک غده‌ای روی برگ (ندارد: ۰، دارد: ۱)	GLLEa
۱۲	میزان برجستگی رگبرگ (برجسته: ۰، تخت: ۱)	MIRI
۱۳	شکل حاشیه برگ (ساده: ۰، سینوسی: ۱، موج: ۲، دندانه‌ای: ۳)	LEMA
۱۴	تراکم دندانه‌های حاشیه برگ (فاقد دندانه: ۰، ۱ تا ۲ دندانه: ۱، ۳ تا ۴ دندانه: ۲، بیش از ۶ دندانه)	LOLM
۱۵	تراکم برگ‌ها روی ساقه (قاعده گیاه: ۱، سرتاسر گیاه: ۲)	LEST
۱۶	رنگ گلبرگ (زرد: ۱، بنفش: ۲)	PECO
۱۷	رنگ کاسبرگ (سبز: ۱، بنفش: ۲)	CACO
۱۸	کرک غده‌ای روی کاسبرگ (ندارد: ۰، دارد: ۱)	GLSEa
۱۹	تراکم گل در گل‌آذین (۵ تا ۱۰ گل: ۱، ۱۱ تا ۱۵ گل: ۲، بیش از ۱۵ گل: ۳)	FDRA
۲۰	شکل زایده کنار پرچم بلند (به تدریج پهن می‌شود: ۱، بال‌دار: ۲، لوب‌دار: ۳، زایده‌ای: ۴)	SLLS
۲۱	شکل کلاله (سراسن: ۱، مثلثی: ۲، مخروطی کشیده: ۳)	STSH
۲۲	وجود کرک غده‌ای روی خامه (ندارد: ۰، دارد: ۱)	GLSY
۲۳	شکل خورجین (مستطیلی: ۱، خطی: ۲، خطی و دانه تسییحی: ۳)	SISH
۲۴	شکل برجستگی بالای خورجین (گرد: ۱، کشیده: ۲)	SSTI
۲۵	برآمده بودن خورجین (تخت و فشرده: ۱، برآمده: ۲)	SILI

شماره	صفت کیفی	اختصار
۲۶	وجود رگه میانی روی خورجین (ندارد: ۰، دارد: ۱)	MISI
۲۷	تغییرات عرض خورجین در رأس (بدون تغییر: ۰، باریک شونده: ۱)	VSWT
۲۸	وجود کُرک غده‌ای روی خورجین (ندارد: ۰، دارد: ۱)	GLSI
۲۹	وجود کُرک غده‌ای روی پایک (ندارد: ۰، دارد: ۱)	GLSPa
۳۰	شکل بذر (کروی: ۱، بیضوی-کروی: ۲، بیضوی کشیده: ۳، تخم‌مرغی: ۴ و مستطیلی: ۵)	SHSD

شماره	صفت کمی	اختصار	شماره	صفت کمی	اختصار
۱	ضخامت یقه (میلی متر)	BSDI	۲۲	عرض دمگل (میلی متر)	PDWI
۲	ارتفاع گیاه (میلی متر)	PLHE	۲۳	طول میله پرچم بلند (میلی متر)	FLTS
۳	افراستگی ساقه‌ها (زاویه)	STUP	۲۴	طول بساک پرچم بلند (میلی متر)	ALTS
۴	طول برگ (میلی متر)	LELE	۲۵	طول میله پرچم کوتاه (میلی متر)	FLSS
۵	عرض برگ (میلی متر)	LEWI	۲۶	طول بساک پرچم کوتاه (میلی متر)	ALSS
۶	نسبت طول به عرض برگ	LLWI	۲۷	فاصله زائده از رأس میله (میلی متر)	LOTI
۷	طول دمبرگ (میلی متر)	PELE	۲۸	طول خامه (میلی متر)	SYLE
۸	بیشترین عمق بریدگی‌های برگ (میلی متر)	LELO	۲۹	عرض خامه (میلی متر)	SYWI
۹	تراکم کُرک سطح فوقانی برگ (در یک میلی متر مربع)	TDAL	۳۰	تراکم کُرک روی خامه (در یک میلی متر مربع)	TDSY
۱۰	تراکم کُرک سطح تحتانی برگ (در یک میلی متر مربع)	TDPL	۳۱	طول خورجین (میلی متر)	SILE
۱۱	طول گلبرگ (میلی متر)	PTLE	۳۲	عرض خورجین (میلی متر)	SIWI
۱۲	عرض گلبرگ (میلی متر)	PEWI	۳۳	تراکم کُرک روی خورجین (در یک میلی متر مربع)	TDSI
۱۳	طول پهنک (میلی متر)	LILE	۳۴	زاویه خورجین با ساقه (درجه)	ASST
۱۴	طول ناخنک (میلی متر)	CLLE	۳۵	طول پایک خورجین (میلی متر)	STLE
۱۵	عرض ناخنک (میلی متر)	CLWI	۳۶	عرض پایک خورجین (میلی متر)	STWI
۱۶	طول پهنک نسبت به ناخنک	CLLI	۳۷	تراکم کُرک روی پایک (در یک میلی متر مربع)	TDST
۱۷	طول کاسبرگ (میلی متر)	SELE	۳۸	نسبت ضخامت پایک به دمگل	SWPW
۱۸	عرض کاسبرگ (میلی متر)	SEWI	۳۹	نسبت ضخامت پایک به خورجین	SISP
۱۹	نسبت طول گلبرگ به کاسبرگ	SPLE	۴۰	طول بذر (میلی متر)	SDLE
۲۰	تراکم کُرک کاسبرگ (در یک میلی متر مربع)	TRDS	۴۱	بیشترین عرض بذر (میلی متر)	SDWI
۲۱	طول دمگل (میلی متر)	PDLE	۴۲	بیشترین عرض باله (میلی متر)	WISD

تحلیل داده‌ها

توزیع داده‌های کمی با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov بررسی شد. برخی از صفات با توزیع غیر نرمال، با روش‌های مختلف تبدیل (نظیر square root, logarithmic transformation, inverse square transformation و transformation) نرمال شدند. به دلیل داشتن ترکیبی از صفات کمی و کیفی در ماتریکس داده‌ها، از آزمون Kruskal-Wallis (روش آماری غیر پارامتری) برای

بررسی وجود اختلاف معنی‌دار میان داده‌های به کار رفته در تمایز گونه‌ها استفاده شد (Spurrier, 2003). دو آزمون فوق با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. پس از تحلیل، آن دسته از صفاتی که در جدایی گونه‌ها تأثیری نداشتند، برای تحلیل‌های بعدی از ماتریکس صفات حذف شدند. به منظور آزمون روابط بین گونه‌ها بر اساس صفات بررسی شده، تجزیه و تحلیل به مؤلفه اصلی (Principal Component Analysis=PCA) با نرم‌افزار

نشان می‌دهد که بیشترین واریانس، مربوط به محور X است، این محور در تفکیک گونه‌ها تأثیر بیشتری خواهد داشت. در شکل ۲ از تحلیل PCA، صفات: PLHE (ارتفاع گیاه)، SILE (طول خورجین)، LELE (طول برگ)، LEST (تراکم برگ‌ها روی ساقه)، TDSY (تراکم کُرک روی خامه)، LEMA (شکل حاشیه برگ)، SSTI (شکل برجستگی‌های بالای خورجین)، STBR (تراکم ساقه‌ها)، STBD (نوع ساقه‌ها)، PELE (طول دم‌برگ) و SIWI (عرض خورجین) که هم صفات کمی و هم کیفی را شامل می‌شوند، بیشترین بارگذاری را نشان دادند. از این مجموعه، صفات PLHE (ارتفاع گیاه)، SILE (طول خورجین)، LELE (طول برگ)، SSTI (شکل برجستگی‌های بالای خورجین)، STBR (تراکم ساقه‌ها) و SIWI (عرض خورجین) همان صفاتی هستند که در اغلب کلیدهای شناسایی گونه‌های این سرده مورد استفاده قرار می‌گرفتند، اما با توجه به نتایج این تحلیل، صفات LEST (تراکم برگ‌ها روی ساقه)، TDSY (تراکم کُرک روی خامه)، LEMA (شکل حاشیه برگ)، STBD (نوع ساقه‌ها) و PELE (طول دم‌برگ) با توجه به بارگذاری بالای آنها (اهمیت زیاد در جداسازی افراد) می‌توانند در شناسایی کارآمد باشند. نتایج نشان دادند که نمونه‌های مورد مطالعه بر اساس صفات استفاده شده، به سه گروه تقسیم می‌شوند (شکل ۲): گروه اول شامل افراد گونه *M. alyssifolia* است و تمامی صفاتی که در قسمت یک چهارم پایینی سمت راست شکل ۲ آمده است، برای افراد این گونه بیشترین مقدار را دارا هستند. از میان این صفات برخی مانند LESH (شکل برگ‌ها)، PDLE (طول دم‌گل)، SDWI (بیشترین عرض باله)، SDLE (طول بذر)،

CANOCO نسخه ۴/۵ (Ter Braak and Smilauer, 2002) صورت گرفت. این روش، افراد را در یک فضای چند بعدی قرار می‌دهد، به طوری که بیشترین واریانس‌هایی که با هم همبستگی ندارند در امتداد محورهای متفاوت استخراج می‌شوند (Otieno *et al.*, 2006). با این تحلیل بدون این که ارزش صفات تغییر کند، داده‌های خام تبدیل به متغیرهای همبسته می‌شود (Everitt and Dunn, 2001).

به منظور یافتن صفات متمایزکننده بین جفت آرایه‌هایی که در تحلیل PCA تباین کافی را نشان ندادند، آزمون Mann-Whitney U (برای آزمون‌های غیر پارامتری دو نمونه مستقل کاربرد دارد) با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد.

نتایج

آزمون Kruskal-Wallis

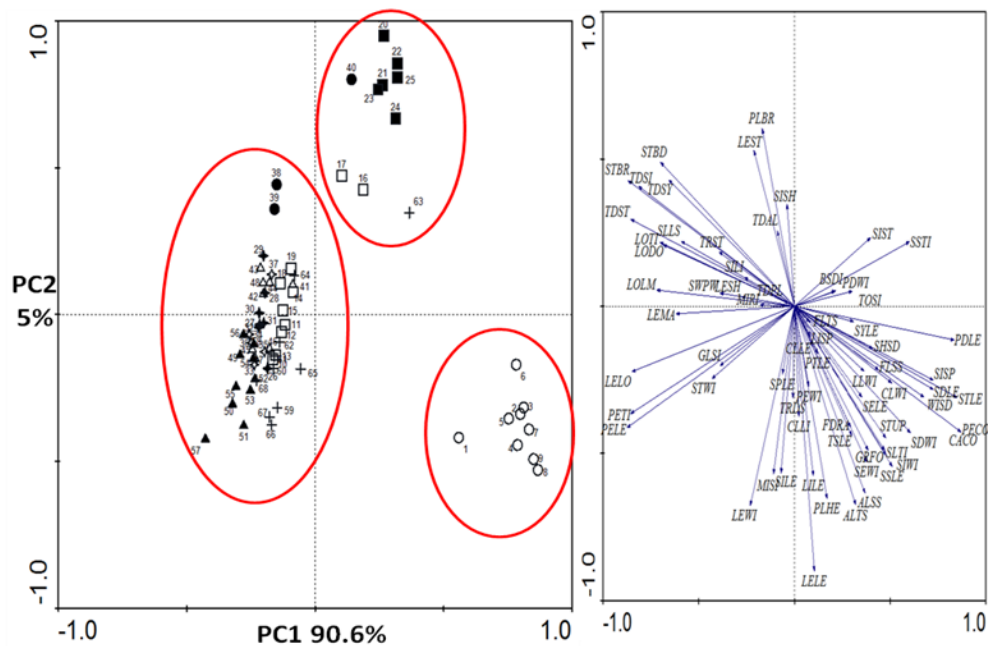
در آزمون Kruskal-Wallis با سطح اطمینان ۹۵ درصد که برای تمامی صفات انجام شد، تفاوت معنی‌داری برای چهار صفت GLSP (وجود کُرک غده‌ای روی پایک خورجین، $P=0.17$)، GLLE (وجود کُرک غده‌ای روی برگ، $P=0.34$)، GLSE (وجود کُرک غده‌ای روی کاسبرگ، $P=0.12$) و GLST (وجود کُرک غده‌ای روی ساقه، $P=0.42$) (جدول ۲) در بین گونه‌ها وجود نداشت. این صفات از ماتریکس صفات حذف شدند و در تحلیل چند متغیره استفاده نشدند.

تحلیل (Principal Component Analysis) PCA

در تحلیل PCA، درصد واریانس محاسبه شده در محور اول، ۹۰/۶ درصد، محور دوم، ۵ درصد و محور سوم ۲/۲ درصد از تغییرات را نشان داده است. این اعداد

دندانه‌های حاشیه برگ (PETI) (داشتن دم‌برگ) در عدم جدایی این گونه‌ها مؤثر بوده‌اند. تحلیل تک متغیره Mann-Whitney U بر روی گونه‌های موجود در این گروه انجام شد. نتایج این آزمون (جدول‌های ۳ و ۴) نشان می‌دهد که علیرغم تفکیک‌ناپذیری اعضای این گروه در تحلیل چند متغیره (شکل ۲)، صفات متعددی در جدایی جفت گونه‌های این گروه وجود دارند که قابلیت استفاده در کلید شناسایی را خواهند داشت. گروه سوم نیز به واسطه صفاتی مانند SIST (زاویه قرارگیری خورجین نسبت به ساقه)، LEST (تراکم برگ‌ها روی ساقه) و PDWI (عرض دم‌گل) در کنار یکدیگر قرار گرفته که شامل افراد گونه *M. revoluta* و برخی از افراد گونه *M. chorassanica* می‌شوند.

PECO (رنگ گلبرگ)، CACO (رنگ کاسبرگ)، LELE (طول برگ) و SIWI (عرض خورجین) می‌توانند در شناسایی افراد این گونه کارآمد باشند. گروه دوم افراد گونه‌های: *M. afghanica*، *M. farinosa*، *M. dumulosa*، *M. chenopodiifolia* و *M. flavida* و آرایه ناشناخته *Matthiola* sp. که با کلیدهای موجود، شناسایی آن مشکل بود با قرابت زیادی در امتداد محور X پراکنده شده‌اند. به نظر می‌رسد که صفاتی مانند LEWI (عرض برگ)، MISI (وجود رگه میانی روی خورجین)، SILE (طول خورجین)، PELE (طول دم‌برگ)، LELO (بیشترین عمق بریدگی برگ)، LEMA (شکل حاشیه برگ)، TDST (تراکم برگ روی پایک خورجین)، LOLM (تراکم



شکل ۲- دیاگرام حاصل از تجزیه و تحلیل PCA مربوط به ۶۸ نمونه مطالعه شده بر اساس محور اول و دوم. دیاگرام سمت راست بارگذاری صفات و دیاگرام سمت چپ موقعیت افراد گونه‌های مختلف بر اساس صفات مورد بررسی را نشان می‌دهد.

◊: *Matthiola* sp.، +: *M. afghanica*، ○: *M. alyssifolia*، □: *M. chenopodiifolia*، ●: *M. chorassanica*، △: *M. dumulosa*، ▲: *M. farinosa* و ●: *M. revolute* (درصد واریانس محاسبه شده در هر محور در کنار محور مربوط آورده شده است).

جدول ۳- صفات متمایزکننده معنی‌دار بین جفت گونه‌های مطالعه شده با استفاده از تحلیل Mann-Whitney U

<i>M. afghanica/ M. dumulosa</i>	<i>M. afghanica/ M. flavida</i>	<i>Matthiola sp./ M. afghanica</i>
TDPL	TDST	PLBR
SELE	SLTI	CLWI
SYLE	LESH	CLLI
TDSY	CLLE	SELE
STWI	CLWI	SPLE
SWPW	SELE	TRDS
SILI	TRDS	FLTS
MISI	ALTS	ALTS
SDLE	SLLS	SLLS
SDWI	TDSY	SYLE
SHSD	SILE	TOSI
SHSD	TDSI	STWI
WISD	SSTI	MISI
-	TOSI	LOLM
-	STLE	SDWI
-	MISI	-
-	SDWI	-

جدول ۴- صفات متمایزکننده معنی‌دار بین آرایه ناشناخته *Matthiola sp.* و گونه‌هایی که در گراف حاصل از تحلیل چند متغیره (PCA) قرابت بالایی داشتند (با استفاده از تحلیل Mann-Whitney U).

<i>Matthiola sp./ M. dumulosa</i>	<i>Matthiola sp./ M. alyssifolia</i>	<i>Matthiola sp./ M. chenopodiifolia</i>
TDPL	PLBR	GRFO
LEMA	GRFO	SLTI
GRFO	PLHE	LESH
PLBR	BSDI	LELO
TDSY	STBD	PETI
SLLS	STUP	CLWI
TRDS	LELE	TRDS
CLWI	LELO	SLLS
SWPW	PELE	TDSI
TRST	LEMA	LOLM
STWI	CLLE	SHSD
SSTI	CLWI	WISD
SDLE	LOTI	-
LOLM	LODO	-
SIST	SYLE	-
SILI	GLSI	-
WISD	STLE	-
-	SIST	-
-	LOLM	-
-	SHSD	-

بحث

گونه‌های مطالعه شده ایجاد نکردند بنابراین، از تحلیل چند متغیره حذف شدند. همان طور که در مقدمه اشاره شد، صفت انواع کرک غده‌ای به فراوانی در کلیدهای شناسایی به کار رفته است. Metcalfe و Chalk (۱۹۵۰) در تحقیقات خود نشان دادند که تیره شب‌بو دارای

از میان تمام صفات کمی و کیفی به کار گرفته شده در این مطالعه، صفات مربوط به وجود کرک غده‌ای بر روی پایک خورجین، برگ، کاسبرگ و ساقه (GISP)، (GLLE، GLSE و GLST) اختلاف معنی‌داری را بین

(2009). دو گونه *M. revoluta* و *M. alyssifolia* با برخی صفات معدود مانند PDWI (عرض دمگل)، SISH (شکل میوه) و LISP (دوره زندگی گیاه)، از افراد سایر گونه‌ها جدا می‌شوند، اما در مورد افراد گونه‌های *M. chorassanica*، *M. afghanica*، *M. dumulosa*، *M. farinosa* و *M. flavida* نزدیکی صفات، امکان تباین افراد این گونه‌ها را از بین می‌برد و احتمالاً افراد این گونه‌ها خویشاوندی بسیار نزدیکی با یکدیگر دارند (شکل ۲). در این بررسی دیده شد که صفات زایشی (ابعاد و اشکال اجزای گل) به استثنای صفات میوه و بذر (مانند SILE (طول خورجین)، MISI (رگه میانی روی سطح خورجین) و SHSD (شکل بذر))، بین گونه‌های این سرده به طور قابل ملاحظه‌ای ثابت بوده، تغییراتی را نشان نمی‌دهند. بنابراین، این صفات در شناسایی کارآمد نیستند. جدایی‌ها و تمایز گونه‌ها عمدتاً به سبب صفات رویشی مانند PLHE (ارتفاع گیاه)، LELE (طول برگ)، LEST (تراکم برگ‌ها روی ساقه)، STBD (نوع ساقه‌ها)، PELE (طول دمبرگ) (شکل ۲) و LEWI (عرض برگ)، PLBR (انشعابات گیاه)، LELO (عرض عمیق‌ترین لوب برگ)، MIRI (وضعیت رگبرگ)، LOLM (تراکم دندان‌های حاشیه برگ)، STBD (تراکم ساقه‌ها) و LEST (تجمع برگ‌ها) (شکل ۲) بوده است.

به نظر می‌رسد، افرادی که طی شناسایی به عنوان گونه *M. flavida* شناخته و تحلیل شدند، هیچ خویشاوندی با گونه *M. chorassanica* ندارند (شکل ۲). در فلور چین (Taiyan et al., 2001) و فلورا ایرانیکا (Rechinger, 1982) اشاره شده است که افراد این دو گونه به اشتباه به جای یکدیگر شناسایی

اشکال متنوعی از گُرک‌های غیر غده‌ای تک‌سلولی تا چندشاخه‌ای و ستاره‌ای و همچنین گُرک‌های غده‌ای هستند. Abdel Khalik (۲۰۰۵) اشاره کرده است که گُرک‌های غده‌ای (چند سلولی) برای تشخیص برخی گونه‌های *Matthiola* استفاده می‌شود، اما در این مطالعه به نظر می‌رسد که بین گونه‌های مختلف این سرده، تنوعی در گُرک‌های غده‌ای و غیرغده‌ای دیده نمی‌شود و همگی دارای گُرک‌های غیر غده‌ای چندشاخه‌ای و درختی‌اند. بنابراین، احتمالاً نوع گُرک نمی‌تواند ویژگی مناسبی برای جداسازی گونه‌های این سرده باشد. از سوی دیگر، چون تراکم گُرک نیز تا حدودی وابسته به شرایط محیطی است، نمی‌تواند به‌عنوان یک صفت قابل اطمینان برای شناسایی استفاده شود (Pigliucci, 1997؛ Gianoli and González-Teuber, 2005). برای مثال در *M. alyssifolia* تمامی افراد دارای ساقه صاف و بدون گُرک بودند و تنها یک فرد در آنها تراکم تنکی از گُرک‌ها داشت و در بیشتر افراد *M. flavida* گُرک‌های غده‌ای روی خورجین، پایک خورجین، ساقه و دمگل دیده شد، اما در سایر گونه‌ها فقط برخی افراد دارای گُرک‌های غده‌ای روی اجزای خود بودند.

در بررسی حاضر، نتایج تحلیل چند متغیره PCA (شکل ۲) نشان داد که گونه‌های سرده *Matthiola* در شمال شرق ایران فاقد مرز مشخص و دقیق تاکسونومیک است و نمی‌توان صفات ریخت‌شناسی ایده‌آلی یافت که تمایز کافی بین گونه‌های آن ایجاد کنند. به طور مشابه در مطالعه‌ای که بر روی گونه‌های *Matthiola* در جزایر قناری انجام شده است، تنوع بالایی در صفات ریخت‌شناسی مشاهده شده است که کارایی چندانی در تشخیص گونه‌ها نداشتند (Jaén-Molina et al.,

زندگی (LISP) می‌تواند صفتی متمایز کننده برای افراد این گونه باشد (سایر گونه‌ها چند ساله هستند). این گونه، تنها گونه یک‌ساله از این سرده در ایران است. صفات رویشی و زایشی دیگری نیز در جدا کردن افراد این گونه از افراد سایر گونه‌ها نقش داشته‌اند از جمله: LESH (شکل برگ)، SPLE (نسبت طول گلبرگ به کاسبرگ)، SISH (شکل کلی خورجین)، PDWI (عرض دمگل) و LILE (طول پهنک) (شکل ۲) که البته تا حدودی در کلیدهای شناسایی نیز از آنها استفاده می‌شود.

آنچه در مورد گونه *M. revoluta* شایان توجه است این است که نام این گونه از پیچش رو به بیرون گلبرگ‌ها در حالت خشک گرفته شده است (Rechinger, 1982). این صفت در اکثر افراد این گونه مشاهده شد، اما از آن جا که نحوه پرس نمودن گیاه روی کیفیت این صفت مؤثر است، در صفات اندازه‌گیری شده وارد نشد. این صفت را می‌توان به همراه سایر صفات، در شناسایی به کار برد. همان طور که در شکل ۲ آمده، افراد این گونه به واسطه صفات زایشی مانند PEWI (عرض گلبرگ)، FDRA (تراکم گل در گل آذین)، CLWI (عرض ناخنک)، SDWI (بیشترین عرض بذر)، WISD (بیشترین عرض باله)، SDLE (طول بذر) و SISP (نسبت ضخامت پایک خورجین به ضخامت خورجین) از سایر گونه‌ها جدا شده‌اند.

همان طور که اشاره شد در فلورا ایرانیکا (Rechinger, 1982)، تشخیص دو گونه *M. dumulosa* و *M. afghanica* بر اساس "ساقه کاملاً چوبی" و "فقط در قاعده چوبی" است. از سوی دیگر، در شرح بیان شده برای این دو آرایه، همپوشانی دامنه

می‌شوند، در حالی که *M. chorassanica* یک گونه نیمه‌پشته‌ای (ascendant) و *M. flavida* یک گونه افراشته (erect) است. در این بررسی دیده شد که صفاتی مانند LEMA (شکل حاشیه برگ)، LELO (عرض عمیق‌ترین فرورفتگی برگ)، PETI (داشتن دمبرگ) و STWI (عرض پایک خورجین)، افراد گونه *M. flavida* را کاملاً از گونه *M. chorassanica* متمایز می‌سازند (شکل ۲).

در بررسی حاضر، از صفات مربوط به بذر استفاده شد که در کلیدهای شناسایی نیز به صورت جزئی به آنها اشاره شده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که صفات شکل بذر (SHSD) و بیشینه عرض باله (SDWI) می‌توانند قابل استفاده باشد. به ویژه در گونه *M. alyssifolia*، شکل و اندازه بذر کاملاً از بذر سایر گونه‌های این سرده متمایز هستند (شکل ۲ و جدول ۴). در گونه *M. farinosa* (شکل ۲)، صفات مربوط به خورجین شامل SILE (طول خورجین)، SIWI (عرض خورجین)، SILI (برآمده بودن خورجین)، MISI (وجود رگه میانی روی خورجین) و SISP (نسبت ضخامت پایک به خورجین) صفات مناسبی در متمایز ساختن این گونه از سایر گونه‌ها بوده، در کلیدهای شناسایی نیز به خوبی از آنها استفاده شده است. صفات مربوط به برگ مانند LELE (طول برگ)، LEWI (عرض برگ)، MIRI (وضعیت رگبرگ)، SLTI (شکل نوک برگ) و LLWI (نسبت طول به عرض برگ) به علت تغییرات زیاد، نمی‌توانند صفات مناسبی برای جدایی این گونه باشند (شکل ۲).

همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، در گونه یک‌ساله *M. chenopodiifolia* بردار صفت دوره

صفات مشاهده می‌شود و تحلیل PCA نیز نتوانست تباین کافی را بین این دو آرایه فراهم کند. نتایج تحلیل Mann-Whitney U (جدول ۳) نشان داد که تنها صفات مربوط به بذر SDWI (بیشترین عرض بذر)، SHSD (شکل بذر) و WISD (طول باله) می‌توانند در تشخیص این دو آرایه ارزشمند باشند. البته صفات دیگری نیز اختلاف معنی‌داری را نشان دادند، اما با در نظر گرفتن ایجاد خطا در هنگام شناسایی (در صفاتی مانند فشردگی میوه و یا تراکم گُرک) به نظر می‌رسد که به کارگیری این صفات قابل استناد نیست.

صفات ابعاد ناخنک (CLWI و CLLE)، میوه خورجین (SILE و STLE)، صفت بذر (SDWI) و شکل زایده کنار میله پرچم بلند (SLLS)، صفات تمایزدهنده بین دو آرایه *M. flavida* و *M. afghanica* هستند (جدول ۳). این صفات از جمله صفاتی هستند که در کلیدهای شناسایی به کار گرفته نشده، می‌توانند در شناسایی کارآمد باشند.

همان‌طور که گفته شد نمونه‌های آرایه ناشناخته *Matthiola* sp. با نمونه‌های دیگر گونه‌های نزدیک *M. chenopodiifolia*، *M. alyssifolia*، *M. afghanica* و *M. dumulosa* با آزمون Mann-Whitney U تحلیل شده بودند (جدول‌های ۳ و ۴). در مقایسه‌ای که بین این آرایه و *M. afghanica* که نزدیکی زیادی با هم نشان می‌دادند (جدول ۳)، صفات مربوط به ناخنک (CLWI و CLLI)، بذر (SDWI)، دندانه‌های حاشیه برگ (LOLM) و شکل زایده کنار میله پرچم بلند (SLLS) بین این دو آرایه تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهند. از بین گونه‌هایی که با این آرایه نزدیکی بیشتری نشان دادند (*M. chenopodiifolia*، *M. alyssifolia*) و *M. dumulosa* افرادی مد نظر قرار گرفتند که از نظر

جغرافیایی نیز نزدیک محل جمع‌آوری افراد آرایه ناشناخته (کوه سرخ کاشمر) بودند. از آنجا که صفات رویشی بسیار تحت تأثیر محیط هستند (Pigliucci, 1997) و این گونه‌ها نزدیکی جغرافیایی با هم دارند، به نظر می‌رسد که نمی‌توان به شباهت‌های صفات رویشی استناد کرد. مقایسه آرایه *Matthiola* sp. و گونه *M. dumulosa* نشان داد که صفاتی نظیر: LISP (نوع گیاه)، CLWI (عرض ناخنک)، SILI (فشردگی خورجین)، SIST (زاویه قرارگیری خورجین با ساقه)، SDLE (طول بذر) و WISD (طول باله) و یا در مقایسه این آرایه با *M. alyssifolia*، صفاتی چون: LISP (نوع گیاه)، SIST (زاویه قرارگیری خورجین نسبت به ساقه)، GLSI (گُرک غده‌ای روی خورجین)، CLLE (طول ناخنک)، CLWI (عرض ناخنک)، LOTI (محل زایده کنار پرچم)، STLE (طول پایک خورجین) و SHSD (شکل بذر) متمایزکننده هستند (جدول ۴). آنچه از مقایسه این نمونه‌ها با افراد گونه *M. chenopodiifolia* دیده می‌شود، این است که صفاتی مانند: SLLS (شکل زایده پرچم)، SHSD (شکل بذر) و WISD (طول باله) از محدود صفاتی هستند که می‌توانند افراد متعلق به آرایه *Matthiola* sp. را از هر یک از گونه‌هایی که با آن مقایسه شده‌اند، متمایز سازند. از آنجا که این نمونه‌ها (*Matthiola* sp.) با دوره زندگی دو ساله در منطقه‌ای یافت شده‌اند (کوه سرخ کاشمر) که نزدیک به محل جمع‌آوری افرادی از گونه یک‌ساله *M. chenopodiifolia* (شماره هرباریومی 32219، جدول ۱) و از گونه‌های چند ساله *M. alyssifolia* (شماره هرباریومی 12345، جدول ۱) و *M. dumulosa* (شماره هرباریومی 19946، جدول ۱)، هستند و به جز صفت نوع گیاه (LISP)، سایر صفات بسیار شبیه هم هستند، این احتمال وجود دارد که این نمونه‌های ناشناخته، حاصل

صفات مشاهده می‌شود و تحلیل PCA نیز نتوانست تباین کافی را بین این دو آرایه فراهم کند. نتایج تحلیل Mann-Whitney U (جدول ۳) نشان داد که تنها صفات مربوط به بذر SDWI (بیشترین عرض بذر)، SHSD (شکل بذر) و WISD (طول باله) می‌توانند در تشخیص این دو آرایه ارزشمند باشند. البته صفات دیگری نیز اختلاف معنی‌داری را نشان دادند، اما با در نظر گرفتن ایجاد خطا در هنگام شناسایی (در صفاتی مانند فشردگی میوه و یا تراکم گُرک) به نظر می‌رسد که به کارگیری این صفات قابل استناد نیست.

صفات ابعاد ناخنک (CLWI و CLLE)، میوه خورجین (SILE و STLE)، صفت بذر (SDWI) و شکل زایده کنار میله پرچم بلند (SLLS)، صفات تمایزدهنده بین دو آرایه *M. flavida* و *M. afghanica* هستند (جدول ۳). این صفات از جمله صفاتی هستند که در کلیدهای شناسایی به کار گرفته نشده، می‌توانند در شناسایی کارآمد باشند.

همان‌طور که گفته شد نمونه‌های آرایه ناشناخته *Matthiola* sp. با نمونه‌های دیگر گونه‌های نزدیک *M. chenopodiifolia*، *M. alyssifolia*، *M. afghanica* و *M. dumulosa* با آزمون Mann-Whitney U تحلیل شده بودند (جدول‌های ۳ و ۴). در مقایسه‌ای که بین این آرایه و *M. afghanica* که نزدیکی زیادی با هم نشان می‌دادند (جدول ۳)، صفات مربوط به ناخنک (CLWI و CLLI)، بذر (SDWI)، دندانه‌های حاشیه برگ (LOLM) و شکل زایده کنار میله پرچم بلند (SLLS) بین این دو آرایه تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهند. از بین گونه‌هایی که با این آرایه نزدیکی بیشتری نشان دادند (*M. chenopodiifolia*، *M. alyssifolia*) و *M. dumulosa* افرادی مد نظر قرار گرفتند که از نظر

شناسایی این آرایه (*Matthiola* sp.) نیازمند بررسی‌های بیشتر در زمینه مطالعات تشریحی، گرده‌شناسی و به ویژه مطالعات مولکولی باشد. از آن چه تاکنون پیرامون صفات آرایه *Matthiola* sp. صحبت شد شاید بتوان این آرایه را به صورت دو رگه *M. afghanica* × *dumulosa* نشان داد.

دورگ‌گیری بین افراد گونه‌های اشاره شده باشند. همان‌طور که Marhold و Lihova (۲۰۰۶) بیان کردند، تیره شب‌بو دارای تغییرات زیادی در تعداد کروموزوم است و رویداد پلی‌پلوئیدی و جریان ژنی بین گونه‌ای به وفور در سرده‌های این تیره گزارش شده است. به نظر می‌رسد که

کلید شناسایی گونه‌های سرده *Matthiola* در شمال شرق ایران

- (a1) گیاهانی یک‌ساله *M. chenopodiifolia*
- (b) گیاهانی چندساله ۲
- (a2) گلبرگ و کاسبرگ به رنگ بنفش تا ارغوانی، دمگل به طول بیشتر از ۵ میلی‌متر، برگ‌ها ساده و واژ تخم‌مرغی با طول بیش از ۱۰ سانتی‌متر، عرض خورجین بیش از ۴ میلی‌متر، طول بذر بیش از ۶ میلی‌متر، عرض باله بیش از ۴ میلی‌متر *M. alyssifolia*
- (b) گلبرگ به رنگ زرد تیره، کاسبرگ سبز رنگ، طول دمگل کمتر از ۵ میلی‌متر، برگ‌ها ساده تا سینوسی طول کم‌تر از ۱۰ سانتی‌متر، عرض خورجین کم‌تر از ۴ میلی‌متر، طول بذر کمتر از ۶ میلی‌متر، عرض باله کم‌تر از ۴ میلی‌متر ۳
- (a3) گیاه منشعب (با حداقل ۳ انشعاب)، برگ‌ها با حاشیه موج، کمتر از ۱۰ گل در هر گل‌آذین *M. revoluta*
- (b) گیاه عمدتاً با انشعابات اندک (حداکثر ۳ انشعاب اصلی)، برگ‌ها سینوسی ۴
- (a4) گیاه خوابیده بر روی زمین و بوته‌ای، کوتاه و با ارتفاع کمتر از ۲۰ سانتی‌متر *M. chorassanica*
- (b) گیاه افراشته با ارتفاع بیش از ۲۰ سانتی‌متر ۵
- (a5) عرض خورجین بیش از ۳ میلی‌متر، طول خورجین بیش از ۱۰ سانتی‌متر، برگ‌ها کامل با حاشیه موج *M. farinosa*
- (b) عرض خورجین کمتر از ۳ میلی‌متر، طول خورجین کمتر از ۸ سانتی‌متر، برگ‌ها دارای بریدگی ۶
- (a6) گیاه بوته‌ای و نیمه‌افراشته، ساقه اصلی به رنگ سبز روشن تا زرد، بذر بیضوی کشیده با عرض کمتر از ۲ میلی‌متر *M. dumulosa*
- (b) گیاه افراشته، ساقه اصلی سبز رنگ، بذر مستطیلی یا گرد ۷
- (a7) طول برگ‌ها کمتر از ۷ سانتی‌متر، برگ‌ها کامل تا اندکی سینوسی، بذر کاملاً گرد و عرض بیش از ۲ میلی‌متر *M. dumulosa* × *afghanica*
- (b) طول برگ‌ها بیش از ۷ سانتی‌متر، برگ‌ها سینوسی با بریدگی‌های عمیق ۸
- (a8) طول خورجین بین ۵-۶ میلی‌متر، شکل بذر مستطیلی و عرض بذر کم‌تر از ۲ میلی‌متر، طول ناخنک ۷-۸ میلی‌متر *M. afghanica*
- (b) طول خورجین بین ۷-۸ میلی‌متر، شکل بذر بیضی شکل، بیشترین عرض بذر ۱/۵ میلی‌متر، طول ناخنک ۹-۱۰ میلی‌متر *M. flavida*

سپاسگزاری

مشهد و همچنین، خانم‌ها سمیه قائم‌پناه، آسیه اسماعیلی، سمیه مختاری و خدیجه کریمی که در جمع‌آوری نمونه‌ها همکاری نمودند کمال تشکر را دارند.

نگارندگان از زحمات جناب آقای علی اصغر بصیری کارشناس آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه و خانم محبوبه زنگویی کارشناس هرباریوم پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی

منابع

- Abdel Khalik, K. (2005) Morphological studies on trichomes of Brassicaceae in Egypt and taxonomic significance. *Wilhelm Engelmann* 64: 57-73.
- Akhani, H. (2003) Note on the flora of Iran: 4. Two new records and synopsis of the new data on Iranian Cruciferae since *Flora Iranica*. *Candollea* 58(2): 369-385.
- Al-Shehbaz, I. A. (1984) The tribes of Cruciferae (Brassicaceae) in southeastern united state. *Journal of the Arnold Arboretum* 65: 343-373.
- Al-Shehbaz, I. A., Beilstein, M. A. and Kellogg, E. A. (2006) An overview: Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae). *Plant Systematic and Evolution* 259: 89-120.
- Beilstein, M. A., Al-Shehbaz, I. A. and Kellogg, I. A. (2006) Brassicaceae phylogeny and trichome evolution. *American Journal of Botany* 93: 607-619.
- Boissier, E. (1975) *Flora orientalis*. vols. 1-5. Genevae et Basileae. H. Georg, Geneva.
- Chernyakhovskaya, E. G. (1965) *Flora of the U.S.S.R.* 8: 28-806. Academy of Sciences of the USSR, Moskova-leningrad.
- Davis, P. H. (1965) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. vols. 6 and 8, Edinburgh University Press, Scotland.
- Everitt, B. S. and Dunn, G. (2001) *Applied multivariate data analysis*. 2nd edition, John Wiley and Sons Inc., London.
- Ghahreman, A. (1994) *Plant systematics: cormophytes of Iran*. Center for Academic Publication, Tehran (in Persian).
- Gianoli, E. and González-Teuber, M. (2005) Environmental heterogeneity and population differentiation in plasticity to drought in *Convolvulus chilensis* (Convolvulaceae). *Evolutionary Ecology* 19: 603-613.
- Hedge, I. C. (1976) A systematic and geographical survey of old world Cruciferae. In: *The biology and chemistry of the Cruciferae* (Eds. Vaughan, J. G., Macleod, A. J. and Jones, B. M. G.) 1-46. Academic Press, London.
- Jaén-Molina, R., Caujapé-Castells, J., Reyes-Betancort, J. A., Akhiani, H., Fernández-Palacios, O., de Paz, J. P., Febles-Hernández, R. and Marrero-Rodríguez, A. (2009) The molecular phylogeny of *Matthiola* R. Br. (Brassicaceae) inferred from ITS sequences, with special emphasis on the Macaronesian endemics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 972-981.
- Jafri, S. M. H. (1973) *Flora of west Pakistan*. vol. 55. Ferozsons, Karachi.
- Janchen, E. (1942) Das system der Cruciferen. *Österreichische Botanische Zeitschrift* 91: 1-21.
- Legandre, P. and Legandre, L. (1998) *Numerical ecology*. Elsevier, Amsterdam.

- Marhold, K. and Lihova, J. (2006) Polyploidy, hybridization and reticulate evolution: lessons from the Brassicaceae. *Plant Systematics and Evolution* 259: 143-174.
- Metcalf, C. R. and Chalk, L. (1950) *Anatomy of dicotyledons*. vol. 1. Clarendon Press, Oxford.
- Otieno, D. F., Balkwill, K. and Paton, A. J. (2006) A multivariate analysis of morphological variation in the *Hemizygia bracteosa* complex (Lamiaceae, Ocimeae). *Plant Systematics and Evolution* 261: 19-38.
- Pigliucci, M. (1997) Ontogenetic phenotypic plasticity during the reproductive phase in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 84: 887-895.
- Rechinger, K. (1982) *Matthiola* (Cruciferae). *Flora Iranica*. vol. 57. Akademische Druck-u , Verlags Graz.
- Schulz, O. E., Engler, A. and Prantl, K. (1936) *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. Cruciferae. Engelmann, Leipzig.
- Spurrer, J. D. (2003) On the null distribution of the Kruskal-Wallis statistic. *Nonparametric Statistics* 15(6): 685-691.
- Taiyan, Z., Lianl, L., Guang, Y. and Al-Shehbaz, I. A. (2001) *Flora of China*. vol. 8: 1-193. Missouri Botanical Garden, Missouri
- Ter Braak, C. J. F. and Smilauer, P. (2002) *CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for windows: Software for Canonical Community Ordination (version 4)*. Microcomputer Power, Ithaca.
- Warwick, S. I., Sauder, C. A. and Al-Shehbaz, I. A. (2007) Phylogenetic relationship in the tribes Anthonieae, Chorisporeae, Euclidieae and Hesperideae (Brassicaceae) based on nuclear ribosomal ITS DNA sequences. *Missouri Botanical Garden* 94: 56-78.

مقایسه الگوی PCR-RFLP با توالی یابی مستقیم ناحیه ITS نمدارهای هیرکانی

حامد یوسفزاده^{۱*}، حمید بینا^۱ و اباصلت حسینزاده کلاگر^۲
^۱ گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

چکیده

یکی از نشانگرهایی که امروزه به عنوان DNA بارکد برای گونه‌های گیاهی پیشنهاد می‌شود، تعیین توالی ناحیه هسته‌ای ITS است. از آنجا که توالی یابی روشی پُر هزینه و نیازمند زمان طولانی است، این مطالعه با به کارگیری روش PCR-RFLP قصد دارد تا ضمن مطالعه الگوی چند شکلی ناحیه ITS نمدارهای هیرکانی، نتایج این دو روش (توالی یابی و PCR-RFLP) را با یکدیگر مقایسه نماید. به این منظور با استفاده از هشت آنزیم برشی، الگوی الکتروفورزی ۹ گونه نمدار جمع آوری شده از جنگل‌های هیرکانی شمال ایران بررسی شد. نتایج نشان داد که علاوه بر آنزیم *EcoRI* که فاقد جایگاه برش در گیاهان گل دار است، آنزیم *BsrBI* نیز در تمام توالی‌های نمدار مطالعه شده، بدون جایگاه برش است. هر دو روش گونه‌های مورد بررسی را در ۹ گروه مجزا قرار داد و تنها تفاوت در گروه‌بندی گونه *Tilia begonifolia* Steven است که یکی از پایه‌های آن در روش RFLP با گونه *T. hyrcana* Tabari and Colagar و در روش توالی یابی مستقیم با گونه *T. rubra* Rupr. در گروهی مجزا قرار گرفته است. همچنین، میزان همسویی نسبتاً بالای این دو روش با استفاده از آزمون منتل نیز تأیید شد ($t=0/57$). تحلیل PCoA نیز گویای تمایز گونه‌های *T. dasystyla*، *T. hyrcana* و *T. rubra* و با منشأ هیرکانی از یکدیگر است و تنها گونه *T. begonifolia* را نتوانسته است از این گونه‌ها جدا نماید. بنابراین، با توجه به نیاز به صرف زمان و هزینه کمتر برای روش PCR-RFLP ناحیه ITS و نیز همسویی نسبتاً بالای نتایج آن با روش توالی یابی مستقیم، این روش به عنوان روشی مناسب، ساده و کم هزینه برای تبارشناسی گونه‌های گیاهی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: فاصله انداز درونی رونویسی، چندشکلی طولی قطعات برشی، آنزیم برشگر، فیلوژنی

مقدمه

اصلی تشخیص نادرست گونه‌های گیاهی است از سوی دیگر، از دغدغه‌های اصلی متخصصان سیستماتیک گیاهی برای دستیابی به روشی سریع، دقیق و ارزان جهت

روند رو به کاهش تنوع زیستی از یک سو و وقوع دو رگ‌ها و مضاعف‌شدگی کرموزومی که از عوامل

نمدار (*Tilia spp.*) از جمله گیاهانی است که سهولت وقوع پدیده دو رنگ شدن بین گونه‌های مختلف آن و همچنین هم ناحیه‌ای بودن برخی از گونه‌های آن، شناسایی دقیق گونه‌های آن را بر اساس صفات ریخت‌شناسی مشکل نموده است. بنابراین، می‌توان با به کارگیری روش DNA بارکدینگ، از تعداد دقیق گونه‌ها در یک منطقه جغرافیایی اطمینان بیشتری حاصل نمود. در این ارتباط بررسی‌های اندکی روی جنس نمدار انجام شده است. اگرچه تکثیر ناحیه بارکد و توالی یابی مستقیم آن روشی استاندارد در مطالعه بارکدینگ است، اما در برخی موارد محققان ترجیح می‌دهند با استفاده از روش‌های ارزان‌تر، ساده‌تر و با صرف زمان کمتر به نتایج مشابه دست یابند. یکی از این روش‌ها، PCR-RFLP است که گرچه در مقایسه با توالی‌یابی مستقیم دقت کمتری دارد اما برای شناسایی و تفکیک گونه‌ها، در عین ساده و ارزان بودن، کارا و مؤثر است (Nakamura *et al.*, 1998a). با توجه به استفاده از روش توالی‌یابی مستقیم برای شناسایی گونه‌های مختلف جنس نمدار در جنگل‌های شمال ایران توسط Yousefzadeh و همکاران (۲۰۱۲)، تحقیق حاضر در نظر دارد تا با استفاده از روش PCR-RFLP ناحیه ITS به بررسی وجود چند شکلی در ناحیه ITS گونه‌های جنس نمدار و نوع ارتباط آنها با یکدیگر با استفاده از الگوی هضم آنزیمی و سپس مقایسه نتایج حاصل از آن با نتایج حاصل از گروه‌بندی بر اساس توالی‌یابی مستقیم، پردازد.

مواد و روش‌ها

انتخاب نمونه: برای این بررسی چهار گونه نمدار موجود در جنگل هیرکانی شامل: *T. begonifolia*

شناسایی گونه‌های گیاهی است. سیستم‌های شناسایی مبتنی بر DNA علاوه بر سهولت شناسایی گونه‌ها، امکان یافتن گونه‌های جدید را نیز فراهم می‌آورد (Blaxter, 2003; Hebert *et al.*, 2003a, 2003b). در روش DNA بارکدینگ، بخشی از ژنوم که ضمن کوتاه بودن، دارای ویژگی چند شکلی نیز است، برای تفکیک گونه‌های مختلف یک جنس استفاده می‌شود (Hebert *et al.*, 2003a, 2003b; Marshall, 2005). علیرغم توافق عمومی روی سیتوکروم اکسیداز I به عنوان قطعه بارکد برای جانوران، هنوز قطعه ژنوم گیاهی که بتواند برای تمام جنس‌های گیاهی به عنوان بارکد کاربرد داشته باشد، معرفی نشده است. البته چندین جایگاه ژنی کلروپلاستی در گیاهان (به عنوان آگزون‌ها: *atpB* *rbcl*، *matK* *ndhF* و مناطق غیر رمز کننده شامل: *trnL* *trnL-F*) به عنوان بارکد پیشنهاد شده است که بسته به جنس گیاهی مورد مطالعه، کارآیی متفاوتی نیز دارد (Chase *et al.*, 2005). به دلیل فراوانی تکامل شبکه‌ای، دو رگه‌ای شدن آسان و مضاعف‌شدگی کروموزومی، احتمالاً گونه‌زایی غیر تک نیایی (non monophyletic) در گیاهان رایج است. با توجه به این که تأثیرپذیری ژنوم هسته‌ای نسبت به مشکل‌های ناشی از دو رگه‌ای شدن کمتر است، چند سالی است که پژوهشگران تبارشناسی به دنبال شناسایی ژنوم هسته‌ای بارکد برای گیاهان هستند. در این راستا، ناحیه ITS (Internal Transcribed Spacer) به عنوان بارکد برای برخی از گیاهان پیشنهاد شده است (Kress *et al.*, 2005). برای نمونه ناحیه ITS2 به عنوان ناحیه مورد توافق عمومی، به عنوان بارکد برای برخی گیاهان پیشنهاد شده است (Chen *et al.*, 2010).

است با توالی های پرایمری گزارش شده توسط White و همکاران (۱۹۹۰) که شامل پرایمر مستقیم با نام ITS1 (و توالی '5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و پرایمر معکوس با نام ITS4 (و توالی '5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') است، در شرایط دمایی و غلظت نهایی ذکر شده در جدول ۱، صورت گرفت. در بررسی حاضر، برای شناسایی مقدماتی قطعات تکثیری از آنزیم *Taq* و برای تعیین توالی محصولات PCR از آنزیم *Pfu* به دلیل داشتن کیفیت تصحیح بالا (proof-reading) در فرآیند پلی مرازی استفاده شد. برای توالی یابی مستقیم، محصول *Pfu*-PCR قطعه ITS که شامل ITS1-5.8s-ITS2 است، به شرکت MWG آلمان فرستاده شد. استخراج توالی از الکتروفوروگرام های دریافت شده از شرکت MWG با نرم افزار Chromas نسخه ۲ صورت گرفت. مقایسه توالی ها نیز با به کارگیری نرم افزار برخط Blast که از نرم افزارهای برخط بانک NCBI است (www.ncbi.nlm.nih.gov) انجام شد.

Steven (دو پایه)، *T. dasystyla* Steven (دو پایه)، *T. hyrcana* Tabari and Colagar (دو پایه) و *T. rubra* Rupr. (دو پایه) که قبلاً شناسایی تیپ های مختلف روزنه (Yousefzadeh *et al.*, 2010a)، مطالعات ریخت شناسی برگ (Yousefzadeh *et al.*, 2010b) و همچنین ساختار دوم توالی ITS (Yousefzadeh *et al.*, 2012) آنها انجام شده بود، انتخاب و استفاده گردید. همچنین، گونه های موجود در بانک ژن شامل: *T. hetrophylla* Vent.، *T. miqueliana*، *T. hupehensis* Heng و *T. paucicostata* Maximowicz، Maximowicz *T. tomentosa* Moench به ترتیب با کد دسترسی AF460198، DQ120724، AF460197، AF174639 و AF25002 نیز برای ارزیابی استفاده شدند.

استخراج DNA، تکثیر قطعه ITS و توالی یابی مستقیم آن: استخراج DNA ژنومی از برگ نمودار، با استفاده از CTAB و سدیم دودسیل سولفات-پتاسیم استات (Hosseinzadeh Colagar *et al.*, 2010) انجام شد. تکثیر منطقه ITS که شامل ITS1-5.8s-ITS2

جدول ۱- شرایط و غلظت نهایی مواد تشکیل دهنده PCR

<i>Pfu</i> -DNA polymerase-PCR	<i>Taq</i> -DNA polymerase-PCR	
۹۵-۹۴ درجه سانتیگراد برای ۳۶۰ ثانیه	۹۵-۹۴ درجه سانتیگراد برای ۳۶۰ ثانیه	واسرشت اولیه
۵۶ درجه سانتیگراد برای ۴۵ ثانیه	۵۶ درجه سانتیگراد برای ۴۵ ثانیه	اتصال
۷۲ درجه سانتیگراد برای ۹۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتیگراد برای ۶۰ ثانیه	توسعه ۳۲ چرخه
۹۴ درجه سانتیگراد برای ۶۰ ثانیه	۹۴ درجه سانتیگراد برای ۶۰ ثانیه	واسرشت
۷۲ درجه سانتیگراد برای ۷ دقیقه	۷۲ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه	توسعه نهایی
10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 0.1% Triton X100, 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1mg/ml BSA, 2mM MgSO ₄ , 0.2 mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.5 mM of each primer, 20 ng of template DNA and 1.25U <i>Pfu</i> DNA polymerase (Fermentas, Germany)	10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 0.08% Nonidet P40, 1.5 mM MgCl ₂ , 0.2 mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.5 mM of each primer, 20 ng of template DNA and 0.5 U <i>Taq</i> DNA polymerase (Fermentas, Germany)	غلظت نهایی واکنشگرهای PCR

نتایج

الگوی هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم های *EcoRI* و *EcoRV*: برای تأیید قطعه ITS با استفاده از الگوی هضم آنزیمی و الگوی پیش‌بینی شده با نرم‌افزار از دو آنزیم *EcoRV* (دارای یک جایگاه برش در *EcoRI* (بدون جایگاه برش در گیاهان گل‌دار) استفاده گردید. بر اساس الگوی هضم آنزیمی توسط آنزیم *EcoRV* در ژل آگاروز به ترتیب قطعاتی حدود ۴۳۰ و ۳۵۰ جفت بازی مورد انتظار بود که نتایج به دست آمده DNA تکثیر شده را مورد تأیید قرار داد (شکل ۱، ستون ۵). همچنین، نتایج نشان داد که آنزیم *EcoRV* روی محصول PCR دارای برش نبوده است. بنابراین، می‌تواند محصول ITS گیاهان گل‌دار باشد (Jobs and Thien, 1997). بر این اساس الگوی هضم آنزیمی مشاهده شده با الگوی هضم قابل انتظار، یا همان پیش‌بینی شده با نرم‌افزار، کاملاً با یکدیگر مطابقت نشان داد. در تمام تاکسون‌ها در موقعیت ۳۷، آنزیم *HpaI* دارای جایگاه برش است. از بین همه گونه‌های تحت مطالعه، تنها گونه *T. dasystyla* در موقعیت ۲۸۳ توسط آنزیم *Hpy166II* دارای برش است. همچنین این گونه تنها گونه در بین گونه‌های جنس نمدار از جنگل‌های شمال ایران است که در موقعیت ۳۸۳ توسط آنزیم *Hpy166II* بدون جایگاه برش است.

مقایسه گروه‌بندی بر اساس نمره‌دهی با روش

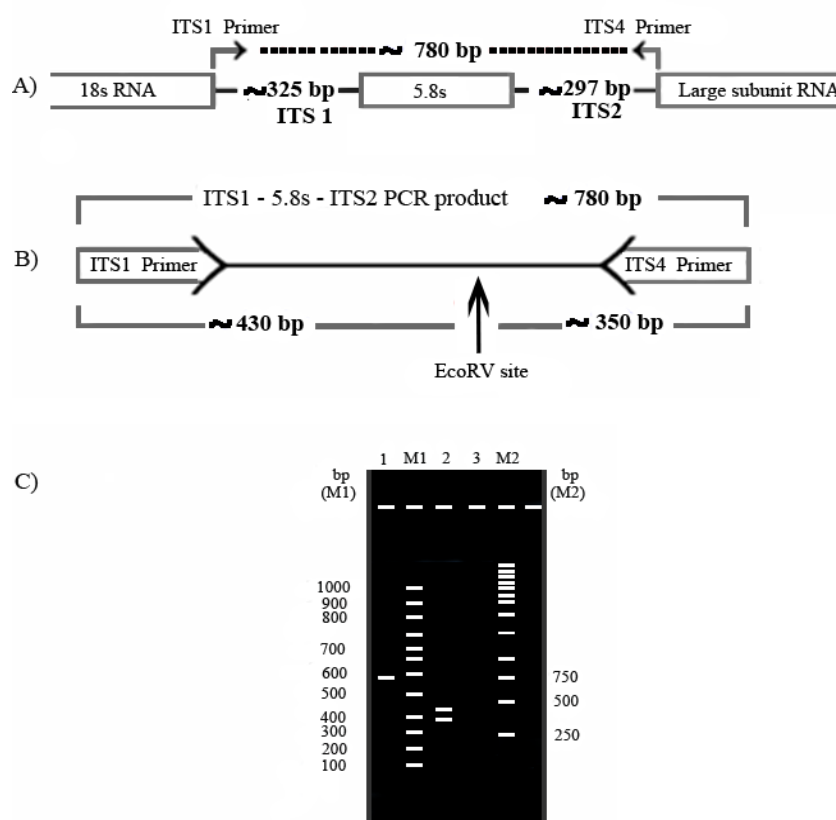
RFLP و روش توالی‌یابی مستقیم: در ابتدا، توالی‌یابی مستقیم منطقه ITS1-5.8s-ITS2 از الکتروفورگرام‌های دریافتی و مقایسه توالی‌ها با نرم‌افزار برخط Blast نشان داد که قطعه مورد نظر به جنس نمدار تعلق دارد. سپس، رسم دندروگرام نمره‌دهی قطعات RFLP با روش

تحلیل RFLP: بر اساس توالی ثبت شده گونه‌هایی

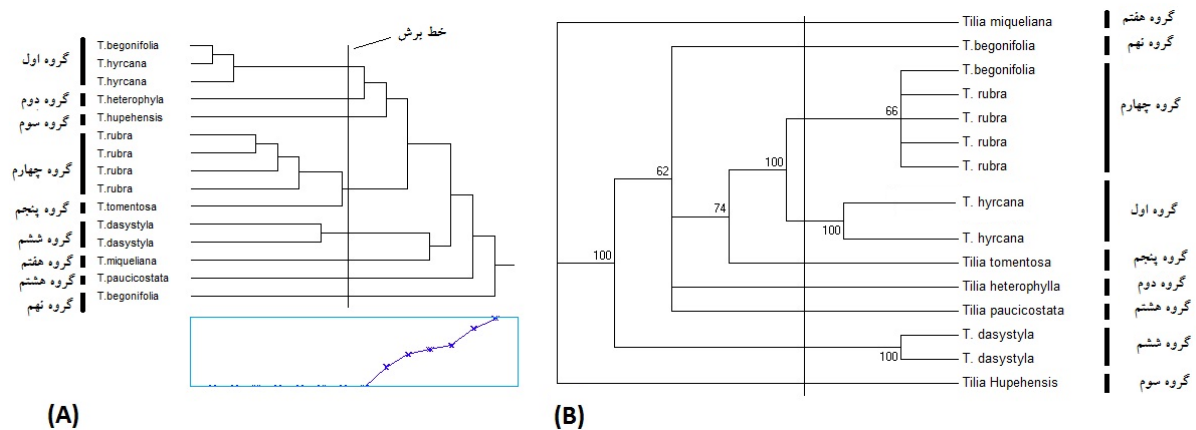
از جنس نمدار در بانک بین‌المللی ژن (NCBI) و با نرم‌افزار برخط Nebcutter نسخه ۲/۰ (<http://tools.neb.com/NEBcutter/index.php>) تعداد ۸ آنزیم برشگر (restriction enzymes) شامل *EcoRI*، *Bsr*، *RsaI*، *HpaI*، *AluI*، *EcoRV*، *Hpy 166II* و *MscI* انتخاب شدند. برای اطمینان از تطابق نتایج تجربی هضم آنزیمی در آزمایشگاه با نتایج محاسباتی هضم آنزیمی با نرم‌افزار، الگوی هضم آنزیمی با دو آنزیم *EcoRI* و *EcoRV* نیز در آزمایشگاه بررسی شد. برای هضم آنزیمی محصولات PCR ابتدا مخلوط واکنشگرهای آنزیمی در حجم کل واکنشگرهای ۱۰ میکرولیتری شامل: ۵ میکرولیتر بافر ۲X، ۰/۲۵ واحد آنزیم و ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر بود، در داخل تیوب های ۰/۵ میلی‌لیتری تهیه شد. پس از ورتکس کوتاه، تیوب‌ها را به مدت ۳ تا ۵ ثانیه سانتریفیوژ شدند. سپس، مخلوط واکنش در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت گرماگذاری شد. سپس برای تأیید، پس از افزودن مقدار ۵ میکرولیتر بافر نمونه DNA، در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز گردید. نمره‌دهی بر اساس اندازه باندها به صورت صفر و یک انجام شد. برای گروه‌بندی گونه‌ها، تجزیه خوشه‌ای به روش سلسله مراتبی و الگوریتم Ward و همکاران (۲۰۰۵) و با استفاده از نرم‌افزار JMP نسخه ۳/۱/۲ انجام شد و مربع فاصله اقلیدسی به عنوان معیار تشابه مورد استفاده قرار گرفت. از تجزیه به مختصات اصلی (Principal Coordinate Analysis; PCoA) به عنوان آزمون مکمل تجزیه خوشه‌ای جهت نمایش میزان تمایز گونه‌ها از یکدیگر (بر اساس شباهت یا عدم شباهت گونه‌ها)، با نرم‌افزار PopTools انجام شد.

Ward و همکاران (۲۰۰۵) و رسم دندروگرام با استفاده از نمره‌دهی توالی یابی مستقیم با روش حداکثر پارسیمونی صورت گرفت. نتایج گروه‌بندی گونه‌های مورد بررسی بر اساس الگوی نمره‌دهی RFLP، آنها را در ۹ گروه مجزا تفکیک نمود (شکل ۲) که این تعداد گروه با نتایج گروه‌بندی بر اساس روش توالی یابی مستقیم و روش حداکثر پارسیمونی مطابقت دارد. در هر دو روش گونه‌های با منشأ غیر هیرکانی در گروه‌های مجزا قرار گرفتند. در ارتباط با گونه‌های منشأ هیرکانی، در هر دو روش گونه‌های

کاملاً مجزا قرار گرفتند. تنها گونه مورد اختلاف گونه *T. begonifolia* است که یکی از پایه‌های آن در روش RFLP با گونه *T. hyrcana* در یک گروه قرار گرفته است. در حالی که در روش توالی یابی مستقیم با گونه *T. rubra* در گروهی مجزا قرار گرفته است (شکل ۲). با استفاده از آزمون منتل نیز میزان تطابق این دو روش با یکدیگر سنجش شد و نتایج نشان‌دهنده همسویی نسبتاً بالای نتایج حاصل از دو روش مورد بررسی است ($r=0.57$).



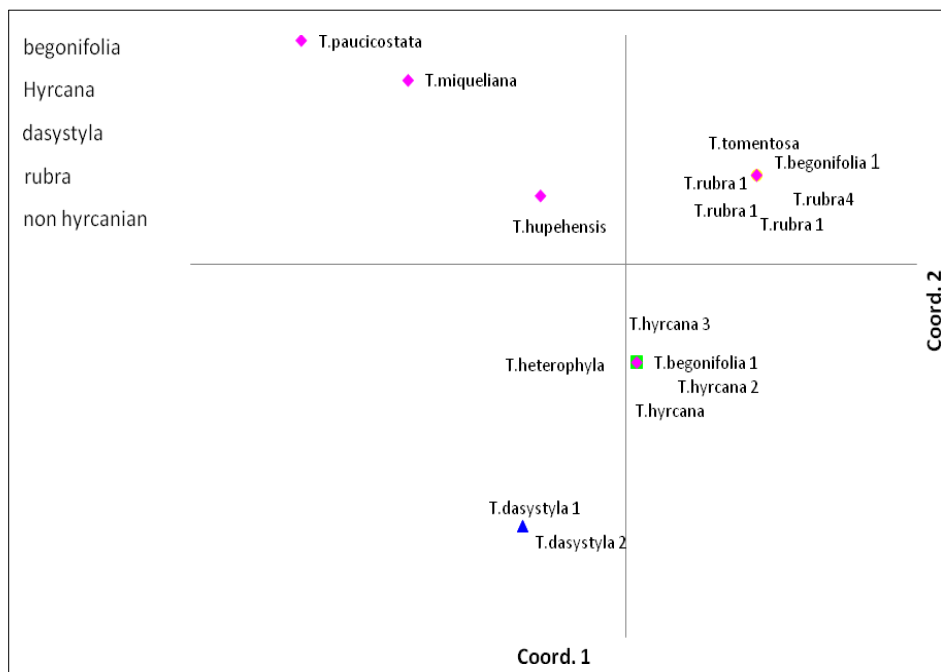
شکل ۱- محصول‌های PCR و هضم آنزیمی قطعه ITS در ژل آگاروز. A) شماتیک پرایمرها و طول فرضی قطعات حاصل از عملکرد آنها در قطعه ITS؛ B) شماتیک الگوی هضم آنزیمی و محصول عملکردی آن روی قطعه ITS1-5.8s-ITS2؛ C) محصول‌های PCR و هضم آنزیمی روی ژل آگاروز ۱ درصد در این ژل. ستون ۱: محصول پرایمرهای ITS1/ITS4، ستون ۲: هضم آنزیمی توسط آنزیم برشگر EcoRV، M1 و M2 نشانگر است.



شکل ۲- مقایسه نتایج گروه‌بندی گونه‌های بررسی شده با روش‌های RFLP و توالی‌یابی مستقیم. (A) دندروگرام رسم شده با نمره‌دهی قطعات RFLP با روش Ward و همکاران (۲۰۰۵)؛ (B) دندروگرام رسم شده با نمره‌دهی توالی‌یابی مستقیم با روش حداکثر پارسیمونی.

دارای فاصله است. اما یکی از پایه‌های گونه *T. begonifolia* با گونه *T. hyrcana* و یکی دیگر از پایه‌های آن با گونه *T. rubra* آمیخته شده است. از نکات جالب توجه این تحلیل، هم مرکزی گونه *T. heterophylla* از منشأ آمریکای شمالی با گونه *T. hyrcana* (گونه جدید تازه معرفی شده از جنگل هیرکانی توسط Yousefzadeh و همکاران، ۲۰۱۲) است.

همچنین، میزان تمایز گونه‌های مطالعه شده به صورت گرافیکی در قالب تحلیل PCoA انجام شد. همان طور که در شکل ۳ مشخص است گونه‌های با منشأ غیر هیرکانی به ویژه گونه‌های *T. hupehensis*، *T. miqueliana* و *T. paucicostata* با فاصله زیادی از گونه‌های موجود در شمال ایران متمایز هستند. در بین گونه‌های هیرکانی نیز مرکز گونه‌های *T. rubra* و *T. hyrcana*، *T. dasystyla* از یکدیگر



شکل ۳- پراکنش گونه‌های مطالعه شده بر اساس محور اول و دوم تحلیل مختصات اصلی (PCoA)

بحث و نتیجه گیری

روش PCR-RFLP روشی کم هزینه برای آشکارسازی چند شکلی ناحیه ITS است (Manhart and Mccourt, 1992). اگرچه نتیجه گیری بر اساس روش PCR-RFLP ناحیه ITS نسبت به روش توالی یابی مستقیم آن دقت پایین تری دارد (Gonzalez *et al.*, 1999)، اما به دلیل ساده، سریع، ارزان بودن و داشتن کارایی بالا (Cocolin *et al.*, 2000)، به طور وسیعی در مطالعه های تاکسونومی و زیست شناسی جمعیت استفاده می شود (Kuninaga *et al.*, 1997; Avise, 1994; Nakamura *et al.*, 1998b; Ristaino *et al.*, 1998). در پژوهش حاضر نیز همسویی نسبتاً بالای نتایج روش مورد مطالعه با نتایج حاصل از توالی یابی مستقیم، گویای کارایی بالای روش PCR-RFLP ناحیه ITS برای تفکیک گونه های مختلف نمودار از یکدیگر است. تنها گونه مطالعه شده که هم بر اساس توالی یابی مستقیم و هم بر اساس روش PCR-RFLP از سایر گونه ها تفکیک نشده است، پایه اول از گونه *T. begonifolia* است. از آنجا که پدیده دو رگه ای شدن در جنس نمودار به ویژه گونه های با ناحیه زیستی هم جا، شایع است احتمال این که گونه اشاره شده پایه ای دو رگ باشد، بسیار محتمل است. چرا که گونه *T. begonifolia* هم در نواحی پراکنش گونه *T. hyrcana* و هم در نواحی پراکنش *T. rubra* حضور دارد. البته انجام مطالعه های کرموزومی و به کارگیری سایر روش های مولکولی در راستای شناسایی پایه های دو رگ می تواند راهگشا باشد.

از دیگر نتایج برجسته پژوهش حاضر، وجود جایگاه برش انحصاری در موقعیت ۲۸۳ توسط آنزیم *Hpy166II* برای گونه *T. dasystyla* است. حضور این گونه قبلاً در جنگل های شمال ایران گزارش شده است

(Pigott and Francis, 1999) و به تازگی نیز Yousefzadeh و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی های دقیق میکروسکوپی و تهیه عکس از خامه گُرک دار که مشخصه اصلی این گونه است، حضور این گونه را در جنگل های شمال ایران تأیید نمودند. این پژوهش نیز نشان داد که چنانچه در مطالعه روی ناحیه ITS پایه های مختلف از جنس نمودار از جنگل هیرکانی، آنزیم *Hpy166II* در موقعیت ۲۸۳ دارای جایگاه برش باشد، گونه مورد نظر گونه *T. dasystyla* است. همچنین، اگرچه سایر پژوهشگران فقدان جایگاه برش توسط آنزیم *EcorI* در ناحیه ITS گیاهان گل دار را گزارش کرده اند (Jobes and Thien, 1997)، اما پژوهش حاضر حداقل در سطح گونه های بررسی شده از جنس نمودار اثبات نمود که آنزیم *BsrBI* نیز روی ناحیه ITS نمودارها بدون جایگاه برش است و در صورت انجام این آزمون روی تمامی گونه های جنس نمودار، می توان با اطمینان گفت که آنزیم *BsrBI* می تواند به عنوان یکی از گزینه ها جهت تأیید ناحیه ITS جنس نمودار حاصل از PCR معرفی گردد. این رهیافت به ویژه برای پژوهشگرانی که در زمینه سنگواره شناسی گیاهی و شناسایی ترکیب جوامع گیاهی گذشته از طریق بررسی فسیل گیاهان مطالعه می کنند، می تواند بسیار مفید باشد. از سوی دیگر، وجود الگوی بانندی اختصاصی مختص به گونه در روش PCR-RFLP، می تواند استفاده از آن را در مطالعات تاکسونومی جنس نمودار، مورد توجه قرار دهد. بر این اساس، چنانچه محققانی قصد مطالعه روی الگوی نواری ناحیه ITS یک جنس از گیاهان جنگلی درختی خاص را داشته باشند، در گام نخست می توانند با اخذ توالی گونه های نزدیک به گونه های مورد مطالعه از بانک های ژنی و اطمینان از تعداد

جایگاه برش، آنزیم‌های مناسب را انتخاب نمایند. چندشکلی ناحیه ITS و مطالعه روابط بین گونه‌ها سپس، با استفاده از روش PCR-RFLP به آشکارسازی بپردازند.

منابع

- Avise, J. C. (1994) Molecular markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York.
- Blaxter, M. (2003) Molecular systematics counting angels with DNA. *Nature and Resources* 421: 122-124.
- Chase, M. W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J. M., Kesanakurthi, R. P., Haider, N. and Savolainen, V. (2005) Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1889-1895.
- Chen, S. L., Yao, H., Han, J. P., Liu C., Song, J. Y., Shi, L. C., Zhu, Y. J., Ma, X. Y., Gao, T., Pang, X. H., Luo, K., Li, Y., Li, X. W., Jia, X. C., Lin, Y. L. and Leon, C. (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One* 5(1): e8613.
- Cocolin, L., Bisson, L. F. and Mills, D. A. (2000) Direct profiling of the yeast dynamics in ine fermentations. *Fems Microbiology Letters* 189(1): 81-87.
- Gonzalez, M. A., Gomez, P. J. and Montoya, R. (1999) Comparison of PCR-RFLP analysis of the ITS region with morphological criteria of various strains of *Dunaliella*. *Journal of Applied Phycology* 10: 573-580.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. and Dewaard, J. R. (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. In: *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 270: 313-321.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. and Dewaard, J. R. (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 270: 596-599.
- Hosseinzadeh Colagar, A., Saadati, M., Zarea, M. and Talei, S. A. (2010) Genetic variation of the Iranian *Sclerotinia sclerotiorum* isolates by standardizing DNA polymorphic fragments. *Biotechnology (Pakistan)* 9(1): 67-72.
- Jobes, D. V. and Thien, L. B. (1997) A conserved motif in the 58S ribosomal RNA (rRNA) gene is a useful diagnostic marker for plant internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Plant Molecular Biology Reporter* 15(4): 326-334.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A. and Janzen, D. H. (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102(23): 8369-8374.
- Kuninaga, S., Natsuaki, T., Takeuchi, T. and Yokosawa, R. (1997) Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics* 32: 237-243.
- Marshall, E. (2005) Will DNA bar codes breathe new life into classification? *Science* 307:1037.
- Nakamura, H., Kaneko, S., Yamaoka, Y. and Kakishima, M. (1998a) Differentiation of *Melampsora* rust species on willows in Japan using PCR-RFLP analysis of ITS regions of ribosomal DNA. *Mycoscience* 39: 105-113.
- Nakamura, T., Arai, T., Takagi, M., Sawada, T., Matsuda, T., Yokota, T. and Heike, T. (1998b) A selective switch-on system for self-renewal of embryonic stem cells using chimeric cytokine receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 248: 22-27.

- Pigott, C. D. and Francis, B. (1999) The taxonomic status of *Tilia dasystyla* in Crimea, Ukraine. *Edinburgh Journal of Botany* 56:161-173.
- Ristaino, J. B., Madritch, M., Trout, C. L. and Parra, G. (1998) PCR amplification of ribosomal DNA species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Applied And Environmental Microbiology* 64: 948-954.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. and Hebert, P. D. N. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 360: 1847-1857.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications* (Eds. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J.) 315-322. Academic Press, Inc., New York.
- Yousefzadeh, H. (2012) Biosystematic genus *Tilia* in northern Iran. PhD thesis, Tarbiat Modares University, Noor, Iran (in Persian).
- Yousefzadeh, H., Hosseinzadeh Colagar, A., Tabari, M., Sattarian, A. and Assadi, M. (2010a) Recognition of different stomata types of *Tilia* spp. in hyrcanian forests. *Taxonomy and Biosystematic* 2(5): 17-28
- Yousefzadeh, H., Hosseinzadeh Colagar, A., Tabari, M., Sattarian, A. and Assadi, M. (2012) Utility of the ITS region sequence and structure for molecular identification of the *Tilia* species from Hyrcanian forest, Iran. *Plant Systematic and Evolution* 298: 947-961
- Yousefzadeh, H., Tabari, M., Hosseinzadeh Colagar, A., Assadi, M., Sattarian, A. and Zare, H. (2010b) Variation in Leaf Morphology of *Tilia* spp. of in Hyrcanian forests. *Taxonomy and Biosystematic* 2(3): 11-24.

مقایسه روش‌های FTIR و تحلیل توالی ژن 16S rDNA در شناسایی و رده‌بندی باکتری‌های متیلوتروف

اسحاق زمانی، مجید بوذری* و گیتی امتیازی
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

تحلیل توالی 16S rDNA اگر چه روشی نسبتاً دقیق و قابل اعتماد برای شناسایی و تاکسونومی باکتری‌هاست اما فرآیندی وقت‌گیر و پرهزینه است. به همین دلیل یافتن راه‌های جایگزین همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است. یکی از روش‌های مطرح FTIR (Fourier Transform Infrared) است که روشی فیزیکو-شیمیایی است مبتنی بر اندازه‌گیری لرزش پیوندهای مولکولی یک ترکیب که به وسیله فرکانس مناسبی از پرتو مادون قرمز تحریک شده‌اند. در این پژوهش که به منظور بررسی کارآیی روش FTIR در شناسایی و تاکسونومی باکتری‌ها و مقایسه آن با روش تحلیل توالی 16S rDNA بر روی باکتری‌های متیلوتروف (مهم‌ترین گروه تجزیه‌کننده مشتقات کلردار متان) صورت گرفت، از ۳۰ باکتری جداسازی شده هفت باکتری انتخاب و ابتدا از طریق تکثیر قسمتی از ژن 16S rDNA و توالی‌یابی آن شناسایی شدند و با نرم‌افزار MEGA5 درخت فیلوژنیک آنها ترسیم گردید. همچنین، با روش FTIR طیف عبور این باکتری‌ها در محدوده $4000-400\text{ cm}^{-1}$ به دست آمد. داده‌های حاصل از این روش با نرم‌افزار SPSS تحلیل شد که دندروگرام حاصل از آن شباهت زیادی (بیش از ۸۰ درصد) به دندروگرام به دست آمده از بررسی توالی 16S rDNA داشت. نتایج نشان داد که FTIR روشی خوبی برای تمایز باکتری‌ها از یکدیگر است اما هنوز نمی‌تواند به تنهایی برای تاکسونومی استفاده شود و اگر بانک اطلاعاتی مناسبی برای داده‌های FTIR ارایه شود این روش می‌تواند به عنوان رقیبی برای تحلیل توالی 16S rDNA مطرح گردد.

واژه‌های کلیدی: تاکسونومی، متیلوتروف، 16S rDNA، FTIR

مقدمه

استفاده کنند. این باکتری‌ها که از نظر مورفولوژی تنوع زیادی دارند، اغلب هوازی هستند و به صورت گسترده در محیط‌های آبی و خاک یافت می‌شوند. جنس‌های گوناگونی از باکتری‌ها در این گروه قرار دارند از جمله: *Methylobacterium*، *Hyphomicrobium*

متیلوتروف‌ها که گروهی از باکتری‌های کم‌واکنش‌تر هستند قادرند از ترکیبات آلی یک کربنه مانند متان، متانول، متیل آمین، فرمات، کلرومتان و ترکیباتی نظیر آنها به عنوان منبع کربن و انرژی

عبور پرتو از میان یک نمونه طول موج های خاصی جذب شده، باعث لرزش هایی مانند کشیدگی، جمع شدگی و خمیدگی پیوندهای شیمیایی در ماده می شوند. گروه های عملکردی موجود در مولکول (نظیر OH، SH و NH) نقش مهمی در این فرآیند دارند. طیف های FTIR باکتری ها می توانند برای ارزیابی ترکیب کلی ساختار آنها از جمله پروتئین ها، اسیدهای چرب، کربوهیدرات ها، نوکلئیک اسیدها و لیپو پلی ساکاریدها استفاده شوند (Duygu *et al.*, 2009؛ Davis and Mauer, 2010).

با توجه به نقش مهمی که باکتری های متیلوتروف از نظر پاکسازی آلاینده های محیطی دارند و اهمیت مطالعه آنها و به منظور بررسی کارآیی روش FTIR در شناسایی و تاکسونومی این باکتری ها و مقایسه آن با روش تحلیل توالی 16S rDNA این پژوهش انجام شد.

مواد و روش ها

جداسازی باکتری های متیلوتروف

برای غنی سازی اولیه این باکتری ها، از محیط کشت معدنی پایه حاوی ۰/۵ درصد متانول استفاده شد. اجزای سازنده این محیط شامل فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۱/۳۶ گرم، سولفات منیزیم ۰/۳ گرم، سولفات آمونیوم ۰/۵ گرم، دی سدیم هیدروژن فسفات ۲/۱۳ گرم و کلرید کلسیم ۱/۹۹ میلی گرم، سولفات آهن ۱ میلی گرم، سولفات منگنز ۰/۳۵ میلی گرم، مولیبدات سدیم ۰/۵ میلی گرم و ویتامین B₁₂ (در صورت نیاز) به میزان ۲/۵ میکروگرم بودند. این اجزا در یک لیتر آب مقطر حل شده و اسیدیته آن بر روی ۷/۲ تنظیم گردید. پس از استریل کردن محیط کشت و خنک شدن آن

Methylomonas، *Methylomicrobium* و

Pseudomonas (Trotsenko and Doronina, 2003).

مشتقات کلردار متان ترکیبات شیمیایی پُر مصرفی هستند که در ساخت خنک کننده ها کاربرد زیادی دارند و در صنعت نیز به عنوان حلال استفاده می شوند. این ترکیبات پایداری بالایی دارند، به مقادیر مختلفی در آب قابل حل هستند، در تخریب لایه ازون نقش دارند و برخی نیز مانند CH₂Cl₂ آثار سمی داشته و خاصیت کارسینوژنیک آنها در موجودات زنده مشخص شده است. بنابراین، آلاینده های محیطی مهمی هستند که مهم ترین راه حذف آنها از محیط، تجزیه زیستی است و باکتری های متیلوتروف مهم ترین گروه زیستی مصرف کننده این ترکیبات شناخته شده اند. لذا، کشت، جداسازی، شناسایی و مطالعه این باکتری ها از اهمیت خاصی برخوردار است (Leisinger and Braus-Stromeier, 1995).

امروزه از روش های گوناگون از جمله روش های مولکولی مانند تحلیل توالی 16S rDNA در شناسایی و تاکسونومی باکتری ها استفاده می شود که گرچه روش نسبتاً دقیقی است اما فرآیندی وقت گیر و پُر هزینه است. از این رو، پژوهشگران به دنبال روش های ساده تر و سریع تر برای جایگزینی آن بوده اند. روش FTIR (Fourier Transform Infrared) که سابقه استفاده از آن در میکروبیولوژی به دهه ۱۹۵۰ بر می گردد، به تازگی به عنوان روشی مناسب برای مقایسه و شناسایی سریع باکتری ها مطرح شده است (Salman *et al.*, 2010 و Ammann and Brandl, 2011). این روش، فیزیکو-شیمیایی بوده، مبتنی بر اندازه گیری لرزش پیوندهای مولکولی ترکیبی است که به وسیله فرکانس مناسبی از پرتو مادون قرمز تحریک شده باشد. در حین

با اضافه کردن NaCl و CTAB اجزای لیز شده سلولی رسوب کرده، با محلول فنل کلروفرم ایزوآمیل الکل از فاز آبی حاوی DNA جداسازی شد. در پایان، DNA توسط ایزوپروپانول رسوب داده شد و پس از شستشو با اتانول در بافر TE به صورت سوسپانسیون در آمد (Ivanova et al., 2000؛ Balachandar et al., 2008).

برای تکثیر بخشی از ژن 16S rDNA از دو پرایمر (3'-AGGAGGTGATCCAACCGC-5') DG74 و (3'-AACTGGAGGAAGGTGGGG-5') RW01 (TAG Copenhagen, Denmark) استفاده شد که قطعه ای در حدود ۳۷۰ جفت باز از این ژن را تکثیر می کند. مخلوط واکنش PCR در هر ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲ میکرولیتر (۱۰ میکرومولار) از هر کدام از پرایمرها، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR، ۰/۵ میکرولیتر (۱۰ میلی مولار) dNTPs، ۰/۷ میکرولیتر (۵۰ میلی مولار) کلرید منیزیم، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۲۵ میکرولیتر (۰/۲۵ واحد) Taq DNA pol (شرکت سیناژن ایران) و ۱۷/۰۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل بود. PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام گرفت. برنامه شامل واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ دور با ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۸ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و یک مرحله نهایی سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بود (Marchesi et al., 1998؛ Balachandar et al., 2008).

تعیین توالی محصول PCR ژن 16S rDNA، شناسایی باکتری ها و ترسیم درخت فیلوژنیک

پس از تکثیر قطعه ۳۷۰ جفت باز از ژن 16S rDNA با روش PCR و بررسی تک باند بودن و

مقدار ۰/۵ درصد متانول به عنوان منبع کربن به آن اضافه، سپس ۲۰ نمونه مختلف از آب و پساب (متعلق به محدوده شهر اصفهان) و صافی های دستگاه تصفیه آب آشامیدنی خانگی به محیط ها تلقیح شد. پس از گذشت حدود یک هفته، ایجاد کدورت در محیط به عنوان نشانه رشد باکتری ها در نظر گرفته شد و پس از آن برای جداسازی و خالص سازی باکتری ها از محیط کشت مورد اشاره که حاوی ۱/۵ درصد آگار بود استفاده شد (Ivanova et al., 2000).

شناسایی باکتری با استفاده از توالی 16S rDNA

پس از جداسازی باکتری ها، برای تکثیر ژن 16S rDNA با روش PCR و تعیین توالی آن ژنوم باکتری ها استخراج گردید، از روش جوشاندن برای این کار استفاده شد و برای نوعی از باکتری ها که دارای رنگدانه بودند از روش CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) استفاده شد. در روش جوشاندن چند کلونی از باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل در یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری به صورت سوسپانسیون در آورده شد سپس، به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش جوشانده شد و پس از خنک شدن به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰ سانتیفریوژ گردید. سپس، مایع رویی که حاوی DNA است به درون یک میکروتیوپ استریل جدید منتقل شد (Ntsaluba et al., 2011). در روش CTAB کشت مایع باکتری که در فاز لگاریتمی است سانتیفریوژ شده، سلول ها در بافر TE (Tris-HCl) ۱۰ میلی مولار + EDTA ۱ میلی مولار، اسیدیته (=۸ سوسپانسیون گردید و پس از افزودن لیزوزیم، پروتئیناز SDS، K و انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد لیز شده، سوسپانسیون به صورت شفاف و چسبناک در آمد آنگاه

شناسایی باکتری با روش FTIR

آماده‌سازی نمونه‌های باکتری: ابتدا باکتری‌ها

روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند. پس از رشد باکتری‌ها، کلونی آنها با آب مقطر استریل از سطح محیط کشت شستشو و در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری جمع‌آوری شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شد. آنگاه محلول رویی خارج و سلول‌ها دست کم سه مرتبه دیگر با آب مقطر استریل شستشو شدند. پس از آخرین شستشو، با خارج نمودن کامل مایع رویی درب میکروتیوب‌ها باز گذاشته شد و به مدت یک شب در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد درون آون قرار داده شدند تا آب آنها تبخیر و کاملاً خشک شود (Davis and Mauer, 2010; Zhao *et al.*, 2006).

تهیه نمونه برای FTIR: مقدار اندکی از جسم

سلولی خشک شده هر باکتری با مقدار مساوی از پتاسیم بروماید (KBr) در هاون مخصوصی مخلوط و به صورت پودر در آورده شد. این پودر بر روی دیسک کریستالی کوچکی قرار داده شد و دیسک به کمک جک مخصوصی تحت فشار قرار گرفت تا پودر بر روی آن تثبیت گردد (Davis; Zhao *et al.*, 2006; and Mauer, 2010).

طیف‌سنجی FTIR، مقایسه باکتری‌ها و رسم

درخت فیلوژنی: پس از آماده‌سازی نمونه، دیسک به دستگاه (JASCO, Spectroscop, FT/IR-6300 Japan) منتقل شد و طیف حاصل از سنجش مقدار عبور در محدوده عدد موج ۴۰۰-۴۰۰۰ بر سانتی‌متر^{-۱} (cm^{-۱}) به دست آمد. اطلاعات به دست آمده از طیف‌سنجی با نرم‌افزار Spektwin32 نسخه ۱/۷۱/۶/۱ (Friedrich Menges, Germany) بررسی و پردازش شد و نتایج آن برای رسم درخت فیلوژنی با نرم‌افزار

عدم آلودگی آن به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگاروز، محصول به سفارش شرکت تکاپو زیست با روش Sanger در شرکت Bioneer کشور کره تعیین توالی گردید. توالی‌های به دست آمده با هر یک از پرایمرها با نرم‌افزار BioEdit نسخه ۷/۱/۷ با یکدیگر هم‌تراز (align) شدند. سپس، با بررسی کروماتوگرام‌های هر یک از این توالی‌ها با نرم‌افزار Chromas Pro نسخه ۱/۷/۴ و اعمال موارد لازم، توالی‌هایی با طول حدود ۳۷۰ نوکلئوتید به دست آمد. در این حالت چون هر نوکلئوتید طی فرآیند توالی‌یابی دو بار خوانده می‌شود، خطای احتمالی به ویژه در ابتدا و انتهای توالی با نرم‌افزارهای اشاره شده قابل اصلاح است. برای شناسایی باکتری‌ها توالی‌های به دست آمده برای هر یک از آنها در پایگاه داده‌های NCBI، توالی‌یابی گردید و با توجه به میزان تشابه و تطابق این توالی‌ها با توالی‌های مرجع (reference sequences) موجود در این پایگاه داده‌ها شناسایی باکتری‌ها انجام شد. علاوه بر این، برای بررسی تاکسونومی این باکتری‌ها و برای ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از توالی 16S rDNA، تعدادی از توالی‌های نزدیک به هر یک از باکتری‌های مورد نظر نیز از NCBI استخراج گردید. از نرم‌افزار MEGA5 برای تحلیل داده‌ها استفاده شد. پس از وارد کردن توالی‌ها و هم‌تراز کردن آنها، از روش تحلیل The average-linkage-between-groups method که اغلب به UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages) شناخته می‌شود، استفاده شد و با این روش الگوریتمی و با بوت استرپ ۵۰۰ درخت فیلوژنی ترسیم شد (Lin *et al.*; Oberreuter *et al.*, 2002; *al.*, 2007).

طیف‌های smooth نشده و normalize کردن آنها مشتق دوم طیف‌ها به دست آمد تا بدین وسیله نواحی و عدد موج‌های حفاظت شده و معنی‌داری که نشان‌دهنده وجود اختلاف بین طیف‌های باکتری‌های مختلف هستند، مشخص شوند. پس از مشخص کردن این عدد موج‌ها میزان عبور (transmittance) در باکتری‌های مختلف تعیین گردید. در مجموع، از ناحیه ۷۰۰ تا ۱۷۰۰ و ۲۸۰۰ تا ۳۰۰۰ حدود ۱۸ عدد موج مشخص برای این منظور در نظر گرفته شد (Holt *et al.*, 1995؛ Davis and Mauer, 2010؛ Lin *et al.*, 2004).

آنگاه میزان عبور برای هر یک از باکتری‌ها در عدد موج‌های مورد نظر مشخص و اطلاعات به دست آمده شامل دو شاخص عدد موج و میزان عبور در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ وارد شد. برای تحلیل داده‌ها و گروه‌بندی باکتری‌ها با استفاده از داده‌های ذکر شده، از تحلیل خوشه‌ای (Hierarchical HCA Cluster Analysis) با به کارگیری روش UPGMA (Between-groups Linkage) و فاصله مربع اقلیدسی (squared euclidian distance) استفاده شد. دومین روش استفاده شده برای تحلیل داده‌ها، روش تحلیل مؤلفه‌های اصلی یا (Principal Component PCA Analysis) بود که روشی رایج برای تشخیص الگو است و به طور گسترده برای تفسیر واریانس در داده‌های طیفی استفاده می‌شود (Holt *et al.*, 1995؛ Davis and Mauer, 2010؛ Lin *et al.*, 2004).

نتایج

در این مطالعه، ابتدا تعداد ۳۰ باکتری از نمونه‌های مختلف آب، پساب و صافی‌های تصفیه آب آشامیدنی خانگی جداسازی شدند که با توجه به نتایج حاصل از

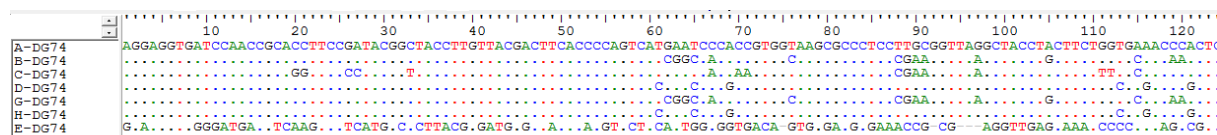
SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد (Rodriguez-Saona *et al.*, 2004؛ Davis and Mauer, 2010؛ Ammann and Brandl, 2011).

در بررسی طیف مادون قرمز (IR) بر روی باکتری‌ها به طور مشخص پنج ناحیه برای شناسایی باکتری‌ها بایستی مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار بگیرد. نخستین ناحیه طیف $2800-3000 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به اسیدهای چرب است. طیف $1500-1700 \text{ cm}^{-1}$ که ناحیه دوم را تشکیل می‌دهد شامل پیوندهای آمیدی I و II پروتئین‌ها و پپتیدهاست. ناحیه سوم که طیف $1200-1500 \text{ cm}^{-1}$ را در بر می‌گیرد ناحیه مخلوطی شامل لرزش‌های خمیدگی اسیدهای چرب، پروتئین‌ها و ترکیبات حاوی فسفات است. ناحیه چهارم که در بر دارنده باندهای جذبی کربوهیدرات‌ها در دیواره سلولی باکتری‌هاست $900-1200 \text{ cm}^{-1}$ را شامل می‌شود و ناحیه پنجم $700-900 \text{ cm}^{-1}$ که ناحیه معروف به اثر انگشت است و شامل باندهای جذبی ضعیف اما کاملاً منحصر به فرد است و برای هر باکتری اختصاصیت بالایی را دارد (Davis and Mauer, 2010).

در یک نگاه کلی به طیف‌های باکتری‌ها، تمام آنها شبیه به هم دیده می‌شوند و شاید نتوان اختلاف زیادی بین آنها دید اما مشتق آنها تفاوت‌های معنی‌داری را در طیف‌ها مشخص تر می‌کند و از آن می‌توان برای ارزیابی شباهت‌ها و تفاوت‌ها در باکتری‌ها استفاده کرد. برای به دست آوردن عدد موج‌های مناسب جهت تفکیک و تمایز باکتری‌ها از یکدیگر علاوه بر استفاده از عدد موج‌های ذکر شده در منابع، از نرم‌افزار Spekwin32 نیز استفاده شد. پس از باز کردن فایل طیف‌های مربوط به تمام باکتری‌ها به صورت همپوشان در محیط نرم افزار و smoothing آنها و سپس حذف

که احتمالاً این باکتری از باکتری‌های دیگر متمایز است. با توجه به نتایج حاصل از توالی‌یابی باکتری‌ها در NCBI مواردی که دارای کمترین ارزش مورد انتظار (= صفر)، بیشترین درصد تشابه و بالاترین امتیاز برای هر یک از توالی‌ها بودند به عنوان ملاکی برای شناسایی مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

برای بررسی روابط تاکسونومیک باکتری‌ها ابتدا دندروگرامی با استفاده از توالی‌های هفت باکتری مورد مطالعه ترسیم شد (شکل ۲). همان‌طور که در این دندروگرام مشاهده می‌شود باکتری‌های D و H در کنار یکدیگر و در یک خوشه قرار گرفته‌اند و نزدیک‌ترین شاخه به آن شاخه‌ای است که باکتری A بر روی آن قرار گرفته است و این سه باکتری به همراه هم خوشه‌ای را تشکیل می‌دهند که از خوشه دیگری که باکتری‌های B و G را بر روی خود جا داده است، جدا شده‌اند. باکتری C در شاخه‌ای جداگانه از خوشه در برگیرنده باکتری‌های A، D و H و B و G قرار دارد. باکتری E در شاخه جداگانه‌ای از تمام باکتری‌های دیگر جدا شده است.



شکل ۱- قسمتی از نتیجه هم‌تراز کردن توالی‌های 16S rDNA باکتری‌ها در نرم‌افزار BioEdit

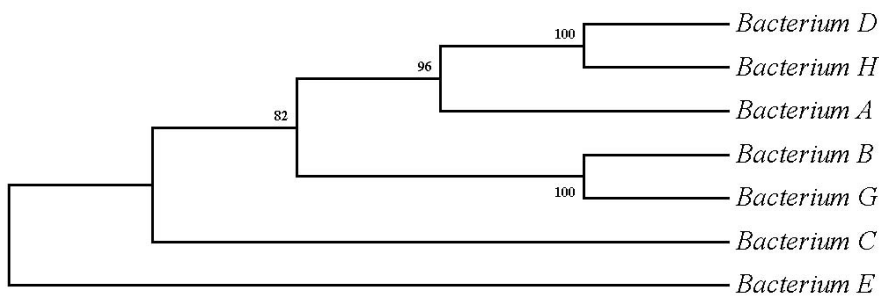
جدول ۱- نتایج BLAST توالی‌های هر یک از باکتری‌ها در NCBI. مقدار همپوشانی توالی مورد نظر (query coverage) برای تمام جدایه‌ها ۹۹ درصد و ارزش مورد انتظار (E-value) برابر با صفر بود.

جدایه	نام گونه	بیشترین امتیاز	بیشترین شباهت
A	<i>Methylobacillus flagellatus</i>	۶۶۴	۹۹ درصد
B	<i>Xantomonas campestris</i>	۶۷۱	۹۹ درصد
C	<i>Klebsiella oxytoca</i>	۶۸۶	۱۰۰ درصد
D	<i>Delftia acidivorans</i>	۶۷۵	۹۹ درصد
E	<i>Methylobacterium populi</i>	۶۶۰	۹۹ درصد
G	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	۶۷۱	۹۹ درصد
H	<i>Delftia acidivorans</i>	۶۷۵	۹۹ درصد

رنگ آمیزی و بررسی مورفولوژی زیر میکروسکوپ و همچنین ویژگی‌های ظاهری کلونی‌ها از میان آنها هفت باکتری برای ادامه کار انتخاب و به ترتیب A، B، C، D، E، G و H نامیده شدند.

از بین این هفت باکتری یکی از آنها یعنی A متیلوتروف اجباری بود که تنها بر روی محیط کشت حاوی متانول رشد کرده، کلونی‌های بی‌رنگ تا قهوه‌ای کم‌رنگ تشکیل داد. باکتری E هم یک باکتری گرم‌منفی با کلونی‌های صورتی تا نارنجی‌رنگ و مانند سایر باکتری‌ها متیلوتروف اختیاری بود. باکتری B دارای کلونی‌های زرد رنگی بود و کمترین میزان رشد متیلوتروپی را داشت. باکتری C نیز که دارای کلونی‌های سفید رنگ و شفاف بود رشد متیلوتروپی نسبتاً خوبی داشت. باکتری‌های D و H نیز شبیه هم بودند و کلونی‌های ریز و شیری رنگ داشتند. باکتری G نیز کلونی‌های زرد کم‌رنگی را تشکیل داد و رشد متیلوتروپی خوبی داشت.

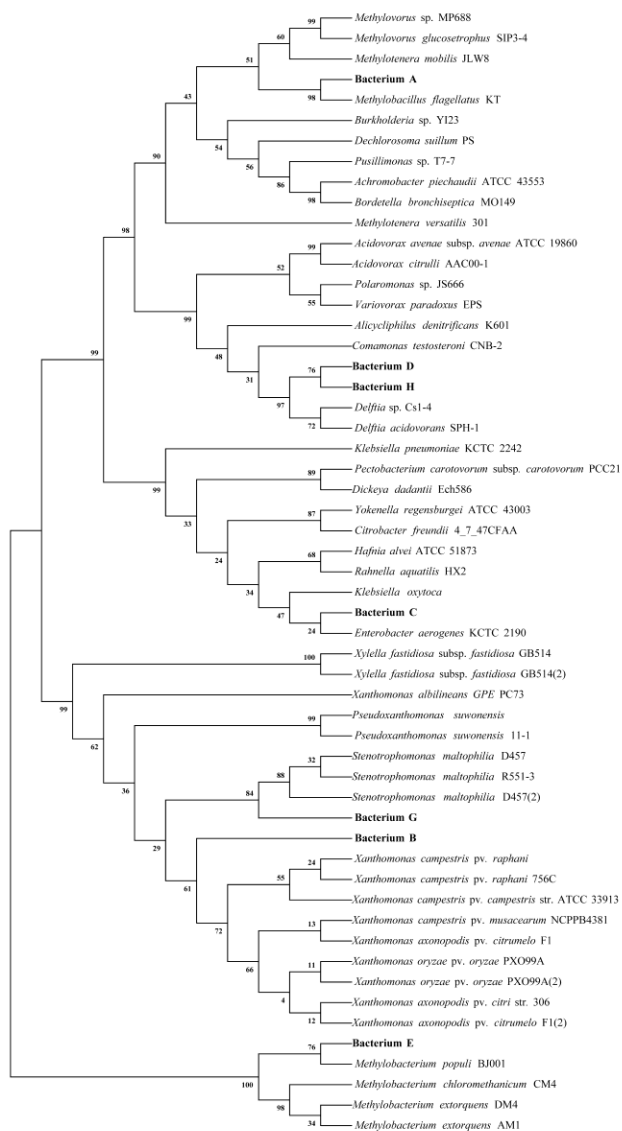
در هم‌تراز کردن توالی‌ها در نرم‌افزار BioEdit، اختلاف کلی بین توالی مربوط به باکتری E با سایر باکتری‌ها مشاهده گردید (شکل ۱) و این بدان معنی است



شکل ۲- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده با استفاده از توالی 16S rDNA با روش UPGMA برای هفت باکتری متیلوتروف جداسازی شده

استخراج شده بودند مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج به دست آمده دندروگرامی است که در شکل ۳ قابل مشاهده است.

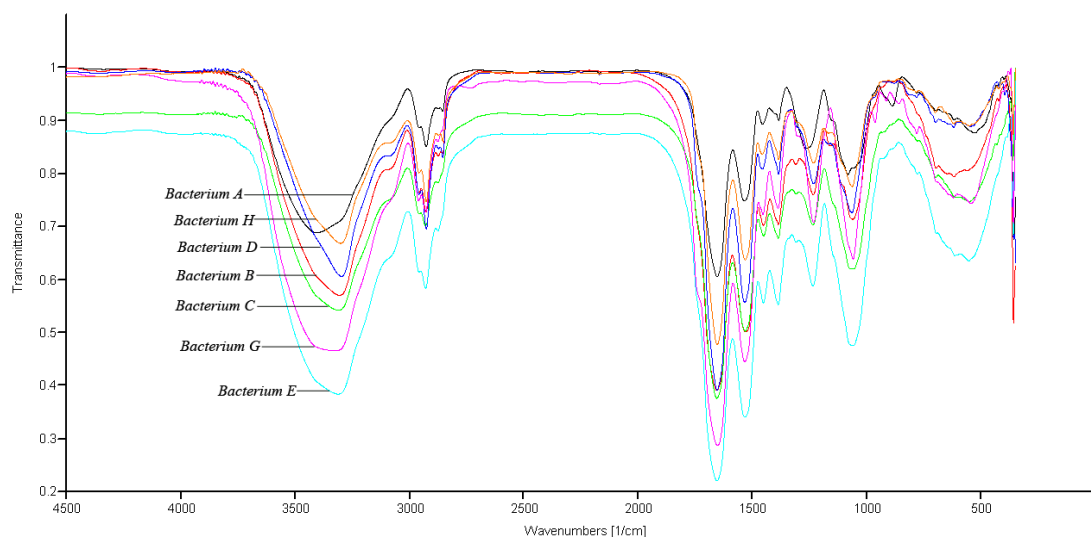
همچنین، برای نشان دادن جایگاه این باکتری ها در میان باکتری های دیگر و بالا بردن دقت، توالی های نزدیک به هر یک از این باکتری ها نیز که از NCBI



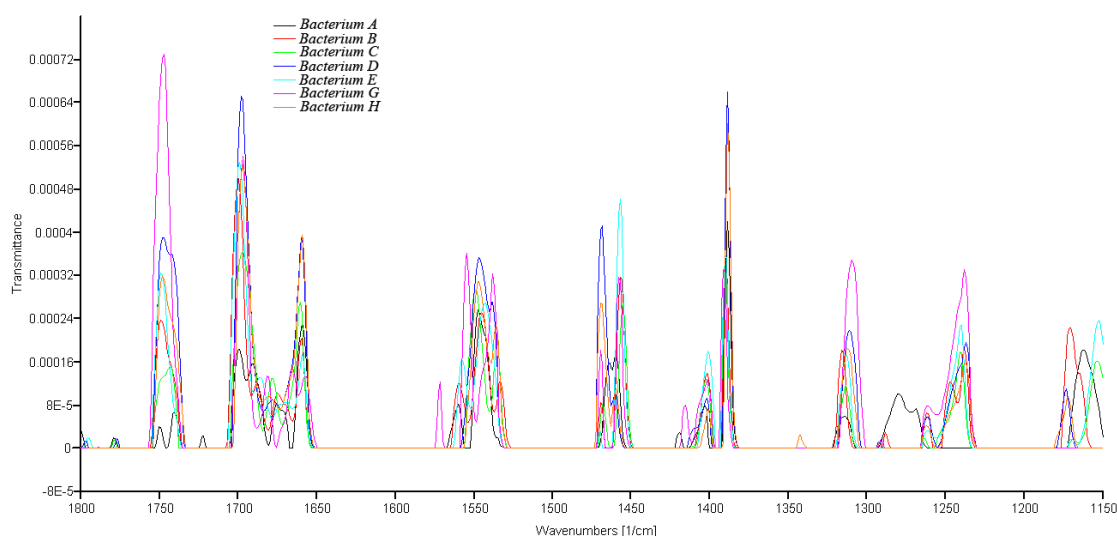
شکل ۳- دندروگرام ترسیم شده با استفاده از توالی های باکتری های متیلوتروف مورد نظر و توالی های استخراج شده از NCBI که موقعیت تاکسونومیک این هفت باکتری را نشان می دهد.

طیف عبوری باکتری‌های مختلف در محدوده $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ در شکل ۴ نشان داده شده است. نکته شایان توجه این است که در یک نگاه کلی طیف‌ها شباهت زیادی به یکدیگر دارند و نمی‌توان تفاوت چندانی بین آنها مشاهده کرد. اما چنان که در شکل ۵ نشان داده شده است با مشتق گرفتن از این طیف‌ها بخش‌هایی از آنها حذف شده، در نواحی باقی مانده بخش‌های مشترک و عدد موج‌های ارزشمندی برای مقایسه طیف‌های باکتری‌های مختلف را مشخص می‌کند.

در این دندروگرام (شکل ۳) نیز تقریباً همان ترتیب جدا شدن باکتری‌ها و قرار گرفتن آنها در شاخه‌ها و خوشه‌ها در میان باکتری‌های دیگر مشاهده شد البته با این تفاوت که باکتری C که در شاخه جداگانه‌ای قرار گرفته بود در دندروگرام جدید در همسایگی خوشه‌ای قرار دارد که باکتری‌های A، D و H بر روی آن قرار دارند و در واقع به این سه باکتری نزدیکتر است تا به باکتری‌های G و B. در این دندروگرام نیز باکتری E در شاخه‌ای به صورت کاملاً مستقل از شش باکتری دیگر قرار گرفته است.

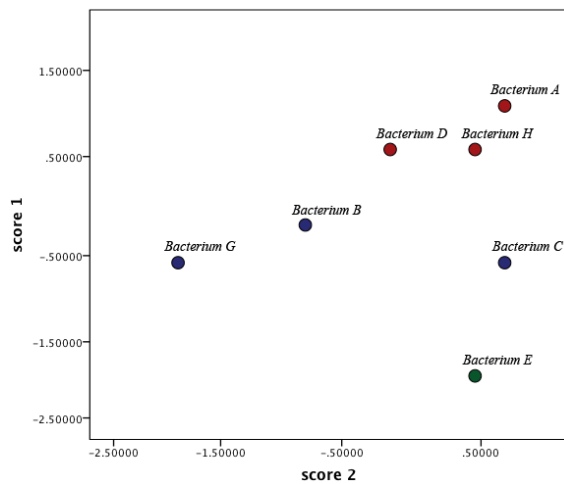


شکل ۴- طیف عبوری باکتری‌های مختلف در محدوده $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ ، در یک دید کلی طیف‌ها شباهت زیادی به یکدیگر دارند.



شکل ۵- بخشی از مشتق طیف‌های عبوری باکتری‌ها ($1800-1150 \text{ cm}^{-1}$). در این شکل نواحی حفاظت شده عدد موج‌ها را می‌توان مشاهده کرد که نواحی ارزشمند به منظور بررسی در باکتری‌های مورد مطالعه هستند.

متیلوتروف مطالعه شده در شکل ۷ نشان داده شده است. چنان که مشاهده می شود الگوی تمایز و جدایی آنها از یکدیگر تا حد زیادی شبیه به الگویی است که در روش HCA یا حتی 16S rDNA دیده می شود. دو باکتری D و H کاملاً نزدیک به هم قرار دارند و باکتری A نیز با فاصله اندکی در کنار آنها قرار گرفته است و می توان آنها را کاملاً به صورت دسته ای جداگانه در نظر گرفت. باکتری های B و G تا حدودی نزدیک به هم و با فاصله اندکی از بقیه باکتری ها قرار دارند و باکتری C نیز اندکی دورتر از آنها قرار گرفته است. اما باکتری E کاملاً مجزا و دور از سایر باکتری ها قرار دارد و تمایز آشکاری را با بقیه نشان می دهد.

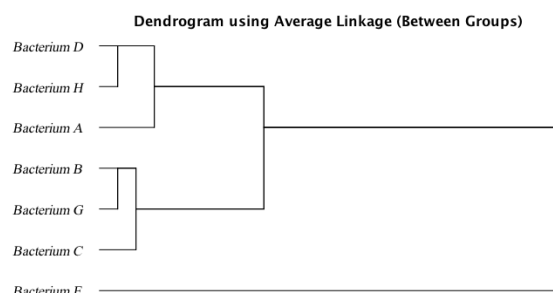


شکل ۷- نتیجه حاصل از تحلیل داده های FTIR با روش PCA

بحث و نتیجه گیری

تحلیل توالی 16S rDNA امروزه به عنوان روشی استاندارد و قابل قبول برای شناسایی و تاکسونومی باکتری ها مورد استفاده قرار می گیرد اما روشی وقت گیر و پُر هزینه محسوب می شود. بنابراین، یافتن روش های قابل اطمینان اما سریع تر و ارزان تر برای این منظور یکی از نکات مورد توجه پژوهشگران بوده است که FTIR یکی از این روش هاست. طی چندین سالی

نتیجه حاصل از تحلیل داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ با روش HCA دندروگرامی است که در شکل ۶ نشان داده شده است. چنان که در این دندروگرام مشاهده می شود همانند دندروگرام ترسیم شده با MEGA5 باکتری های D و H در کنار هم، در یک خوشه از باکتری A جدا شده اند اما این سه باکتری با شباهت بیشتری که به هم داشته اند خوشه ای را تشکیل داده و از سایر باکتری ها جدا گردیده اند. دو باکتری B و G نیز در کنار هم یک خوشه را تشکیل داده و از باکتری C جدا شده اند ولی هر سه آنها نیز با توجه به نزدیکی شان به یکدیگر بر روی یک خوشه قرار گرفته و از سه باکتری قبل جدا شده اند. در اینجا نیز همانند دندروگرام ترسیم شده با اطلاعات توالی 16S rDNA، باکتری E اساساً به صورت یک شاخه مستقل از سایر باکتری ها جدا شده است. نکته جالب توجه در اینجا شباهت قابل ملاحظه ای است که دندروگرام ترسیم شده با اطلاعات توالی های نوکلئوتیدی با دندروگرام ترسیم شده با روش FTIR و بر اساس اطلاعات فیزیکی-شیمیایی ساختار باکتری دارد و به طور کلی اختلاف اصلی این دو نمودار مربوط به جایگاه باکتری C است.



شکل ۶- دندروگرام حاصل از HCA با روش UPGMA بر روی داده های FTIR مربوط به هفت باکتری متیلوتروف

نتیجه حاصل از تحلیل داده های FTIR با استفاده از نرم افزار SPSS با روش PCA برای هفت باکتری

این مسأله وجود نداشته است (Zhao *et al.*, 2006)؛
(Davis and Mauer, 2010).

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر برای مقایسه روش‌های FTIR و 16S rDNA و کارآیی آنها در شناسایی و تاکسونومی باکتری‌های متیلوتروف نشان داد که FTIR روش مناسبی برای تشخیص و تفکیک و تمایز باکتری‌ها از یکدیگر است که می‌توان نتایج آن را با روش 16S rDNA قابل مقایسه دانست. در مورد باکتری‌های D و H توالی 16S rDNA آنها کاملاً شبیه به هم بوده، هیچ تفاوتی را نشان نمی‌دهند اما طیف‌های FTIR این دو باکتری هرچند شبیه هم هستند اما کاملاً یکسان و منطبق بر هم نیستند. این یافته تأیید کننده یافته‌های Zhao و همکاران (۲۰۰۶) است. آنها توانستند با استفاده از FTIR و تحلیل نتایج آن با PCA چهار جدایه از *Streptomyces* را که از نظر توالی 16S rDNA صد در صد با هم شباهت داشتند اما بر اساس ظاهر میسلیموم، اسپور و رنگدانه با هم متفاوت بودند، از یکدیگر تفکیک کنند.

با توجه به این که در این تحقیق مطالعه باکتری‌ها در سطح جنس صورت گرفته است کارآیی روش FTIR را می‌توان تنها در این سطح با اطمینان تأیید کرد. اما این که روش مذکور تا چه سطحی می‌تواند برای تمایز باکتری‌ها کارآیی داشته باشد نیاز به بررسی بیشتر دارد. Oberreuter و همکاران (۲۰۰۲) که تنوع درون‌گونه‌ای را در سه باکتری اکتینومیسیت *Brevibacterium glutamicum* *linens* و *Corynebacterium* روش بررسی کرده‌اند، معتقدند که کارآیی FTIR تنها تا سطح گونه است و در سطح زیرگونه نمی‌تواند معیار مناسبی برای بررسی ارتباط تاکسونومیک باشد. زیرا

که از مطرح شدن FTIR به عنوان روشی کاربردی در میکروبیولوژی می‌گذرد پژوهش‌های مختلفی در این زمینه صورت گرفته است. Davis و Mauer (۲۰۱۰) معتقدند این روش می‌تواند برای تشخیص، تفکیک و سنجش کمی باکتری‌ها جایگزین ابزارهای تشخیصی رایج در صنایع غذایی، دارویی و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی گردد. Duygu و همکاران (۲۰۰۹) مزایای FTIR را سرعت بالای آن نسبت با روش‌های رایج و اختصاصیت آن می‌دانند که می‌تواند در اپیدمیولوژی و کنترل آلودگی‌ها به کار رود. Ammann و Brandl (۲۰۱۱) مزیت FTIR را نیاز به مقادیر اندک نمونه و اختصاصیت بالای آن برای تشخیص اسپور باکتری‌ها حتی در حضور سایر مواد آلی در خاک ذکر می‌کنند. بررسی‌های دیگری نیز که در این زمینه صورت گرفته بیشتر بر روی تشخیص و کنترل پاتوژن‌ها در آب، مواد غذایی و نوشیدنی‌ها متمرکز بوده است که از آن جمله می‌توان به Al-Qadiri و همکاران (۲۰۰۶ و ۲۰۰۸)، Holt و همکاران (۱۹۹۵)، Lin و همکاران (۲۰۰۴) و Rodriguez و همکاران (۲۰۰۴) اشاره کرد. عیب بزرگی که برخی از این پژوهشگران بر آن تأکید می‌کنند نبود بانک جامع اطلاعاتی برای داده‌های طیفی باکتری‌ها در روش FTIR است (Al-Qadiri *et al.*, 2006؛ Ammann and Brandl, 2011).

علاوه بر موارد اشاره شده، برخی از پژوهشگران کارآیی FTIR را به عنوان روشی مناسب برای استفاده در تاکسونومی باکتری‌ها نیز ارزیابی کرده‌اند که برخی آن را تأیید و نتایج آن را قابل مقایسه با روش 16S rDNA و حتی بهتر از آن می‌دانند و برخی نیز آن را زیر سؤال برده‌اند اما تاکنون توافق نظر کاملی بر روی

علاوه بر موارد ذکر شده درباره حساسیت و دقت روش FTIR مزیت مهم دیگری که می توان به آن اشاره کرد این است که تجهیزات و وسایل زیادی نیاز ندارد و میزان مواد مورد استفاده در این روش نیز قابل مقایسه با روش 16S rDNA نیست به طوری که می توان گفت در روش FTIR تقریباً هیچ ماده دیگری به جز KBr استفاده نمی شود و بنابراین از نظر هزینه بسیار ارزان تر و به صرفه تر است. مزیت مهم دیگر زمان بسیار اندکی است که برای انجام آزمون بر روی هر نمونه در روش FTIR مورد نیاز است که این زمان از چند دقیقه تجاوز نمی کند در حالی که در روش 16S rDNA این زمان به چندین ساعت می رسد. نکته آخر این که برخلاف توالی 16S rDNA که بانک های اطلاعاتی و پایگاه داده های بزرگ و روبه گسترشی دارد، تاکنون چنین مرجعی برای داده های FTIR باکتری ها فراهم نشده است که این بزرگترین عیب روش FTIR بوده و محدودیت زیادی برای کاربردی شدن این روش و استفاده از آن برای بررسی های تاکسونومیک و فیلوژنیک در سطح وسیع به وجود آورده است.

هرچند با این روش تنوعاتی در سطح زیرگونه دیده می شود اما این تنوعات متفاوت از تنوعاتی است که با روش 16S rDNA بین سویه ها مشاهده می شود.

در مقایسه نتایج به دست آمده برای گروه بندی باکتری ها، به جز جایگاه باکتری C نتایج تا حد بسیار زیادی در هر دو روش مشابه یکدیگرند. با توجه به این که روش های آماری مختلف برای تفسیر داده های FTIR نتایج کاملاً یکسانی ندارد بنابراین جایگاه باکتری ها در هر روش می تواند با روش دیگر متفاوت باشد و این امر اهمیت چگونگی تحلیل داده ها و تفسیر نتایج را بیشتر مشخص می کند.

با توجه به نتایج به دست آمده کارآیی FTIR را نه می توان کاملاً تأیید و نه کاملاً رد کرد شاید تلفیقی از هر دو روش نتیجه بهتری در بر داشته باشد. بر اساس یافته های Lin و همکاران (۲۰۰۷) برای تحلیل فیلوژنیک جدایه هایی از باکتری *Alicyclobacillus* با استفاده از دو روش FTIR و 16S rDNA ترکیبی از هر دو روش است که می تواند ابزار مناسبی برای شناسایی و تمایز سریع و مطمئن باکتری ها فراهم کند.

منابع

- Al-Qadiri, H. M., Al-Holy, M. A., Lin, M., Alami, M. I., Cavinato, A. G. and Rasco, B. A. (2006) Rapid detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as pure and mixed cultures in bottled drinking water using Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5749-5754.
- Al-Qadiri, H. M., Lin, M., Al-Holy, M. A., Cavinato, A. G. and Rasco, B. A. (2008) Detection of sublethal thermal injury in *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* and *Listeria monocytogenes* using fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy (4000 to 600 cm^{-1}). *Journal of Food Science* 73: M54-M61.
- Ammann, A. B. and Brandl, H. (2011) Detection and differentiation of bacterial spores in a mineral matrix by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and chemometrical data treatment. *BMC Biophysics* 4: 14.
- Balachandar, D., Raja, P. and Sundaram, S. P. (2008) Genetic and metabolic diversity of pink-pigmented facultative methylotrophs in phyllosphere of tropical plants. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 68-73.

- Davis, R. and Mauer, L. J. (2010) Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. In: Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology (Ed. Mendez-Vilas, A.) 2: 1582-1594. Formatex Research Center, Badajoz, Spain.
- Duygu, D., Baykal, T., Acikgoz, I. and Yildiz, K. (2009) Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy for biological studies. Gazi University Journal of Science 22: 117-121.
- Holt, C., Hirst, D., Sutherland, A. and McDonald, F. (1995) Discrimination of species in the genus *Listeria* by Fourier transform infrared spectroscopy and canonical variate analysis. Applied and Environmental Microbiology 61: 377-378.
- Ivanova, E. G., Doronina, N. V., Shepelyakovskaya, A. O., Laman, A. G., Brovko, F. A. and Trotsenko, Y. A. (2000) Facultative and obligate aerobic *Methylobacteria* synthesize cytokinins. Microbiology 69: 646-651.
- Leisinger, T. and Braus-Stromeyer, S. (1995) Bacterial growth with chlorinated methanes. Environmental Health Perspective 103(Suppl5): 33-36.
- Lin, M., Al-Holy M., Al-Qadiri, H., Chang, S., Kang, D. H., Rodgers, B. D. and Rasco, B. A. (2007) Phylogenetic and spectroscopic analysis of *Alicyclobacillus* isolates by 16S rDNA sequencing and mid-infrared spectroscopy. Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety 1: 11-17.
- Lin, M., Al-Holy, M., Al-Qadiri, H., Kang, D. H., Cavinato, A. G., Hung, Y. and Rasco, B. A. (2004) Discrimination of intact and injured *Listeria monocytogenes* by fourier transform infrared spectroscopy and principal component analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 5769-5772.
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J. and Wade, W. G. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 64: 795-799.
- Ntsaluba, L., Agundiade, Q., Mabinya, L. and Okoh, A. (2011) Studies on biofloculant production by *Methylobacterium* sp. Obi isolated from a freshwater environment in South Africa. African Journal of Microbiology Research 5: 4533-4540.
- Oberreuter, H., Charzinski, J. and Scherer, S. (2002) Intraspecific diversity of *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis* based on partial 16S rDNA sequence analysis and Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. Microbiology 148: 1523-1532.
- Rodriguez-Saona, L. E., Khombaty, F. M., Fry, F. S., Dabojs, J. and Calvey, E. M. (2004) Detetion and identification of bacteria in a juice matrix with fourier transform-near infrared spectroscopy and multivariate analysis. Journal of Food Protection 67: 2555-2559.
- Salman, A., Tsrer, L., Pomerants, A., Moreh, R., Mordechai, S. and Huleihel, M. (2010) FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes. Spectroscopy 24: 261-267.
- Trotsenko, Y. A. and Doronina, N. V. (2003) The biology of methylobacteria capable of degrading Halomethanes. Microbiology 72: 121-131.
- Zhao, H., Parry, R. L., Ellis, D. I., Griffith, G. W. and Goodacre, R. (2006) The rapid differentiation of *Streptomyces* isolates using fourier transform infrared spectroscopy. Vibrational Spectroscopy 40: 213-218.

بررسی مولکولی ژن *luxA* برای شناسایی باکتری‌های نورافشان دریای مازندران

مجتبی محسنی* و محدثه صالح‌قمری

گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

چکیده

نورتایی زیستی (بیولومینانس) واکنشی شیمیایی است که سبب نشر نور در موجودات زنده می‌گردد. باکتری‌های نورافشان، فراوان‌ترین موجودات نورافشان در طبیعت هستند. برای شناسایی این باکتری‌ها از آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده می‌شود. بررسی مولکولی ژن *luxA* که توالی آن در باکتری‌های نورافشان متفاوت است، می‌تواند در تشخیص این باکتری‌ها مناسب باشد. در پژوهش حاضر، نتایج تعیین جنس باکتری‌های نورافشان بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *luxA* مقایسه شد. همچنین، نتایج توالی‌یابی ژن 16S rDNA جدایه‌های نورافشان برای تأیید نتایج، بررسی شد. نمونه‌های آب دریای مازندران از ایستگاه‌های متعدد سواحل جنوبی جمع‌آوری شد. باکتری‌های نورافشان با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی SWA و SWB جداسازی و ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی آنها تعیین گردید. پس از گروه‌بندی جنس‌های مختلف باکتری‌های نورافشان بر اساس توالی ژن *luxA* پرایمرهای اختصاصی طراحی و سنتز شد. با استخراج نوکلئیک‌اسید باکتری‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن‌های *luxA* و 16S rDNA انجام شد. پس از تعیین توالی ژن 16S rDNA جدایه‌های باکتری، درخت فیلوژنی نیز رسم شد. تعداد ۹ جدایه باکتریایی نورافشان از آب دریای مازندران جداسازی شد. بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی، تعداد پنج جدایه به جنس *Photobacterium* و چهار جدایه به جنس *Vibrio* متعلق بود. همچنین، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن *luxA* جنس‌های *Photobacterium*، *Aliivibrio* و *Vibrio* به ترتیب با پرایمرهای اختصاصی *luxA1*، *luxA2* و *luxA3* انجام شد. نتایج توالی‌یابی ژن 16S rDNA جنس *Photobacterium*، نشان‌دهنده شباهت بیش از ۹۹ درصد این جدایه‌ها به گونه *P. leiognathi* بود. نتایج تعیین جنس بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و بررسی مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با پرایمرهای اختصاصی *luxA* و نیز نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن 16S rDNA، با یکدیگر مطابقت داشت. بنابراین، پرایمرهای اختصاصی ژن *luxA* می‌تواند برای تعیین اولیه جنس باکتری‌های نورافشان به کار رود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های نورافشان، نورتایی زیستی، دریای مازندران، *luxA*

مقدمه

فرآیند نشر نور در اثر اکسید شدن سوستران نظیر لوسیفیرین و در حضور آنزیم لوسیفراز است. نقش

پدیده نورتایی زیستی در موجودات زنده، شامل

اختصاصی طراحی شده، انجام و توالی ژن rDNA 16S نیز تعیین شد. بررسی ارتباط میان نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی، ژن *luxA* و توالی ژن rDNA 16S از اهداف پژوهش حاضر است.

مواد و روش‌ها

غنی‌سازی و جداسازی

نمونه‌های آب دریا تا عمق ۳۰ متری از سواحل جنوبی دریای مازندران جمع‌آوری و بلافاصله در ظروف استریل درب‌دار و تحت دمای ۴ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل شد. برای جداسازی باکتری‌های نورافشان، نمونه‌های آب در محیط کشت اختصاصی SWB (Sea Water Broth) غنی‌سازی شد. این محیط کشت از مخلوط کردن پیتون ۰/۵ درصد، عصاره مخمر ۰/۵ درصد، عصاره گوشت ۰/۳ درصد، در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دریا تهیه شد. مقدار ۱ میلی‌لیتر آب به محیط کشت مایع SWB تلقیح و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری، نمونه‌های غنی شده به محیط کشت آگاردار SWA (شامل محیط کشت SWB به همراه ۱/۵ درصد آگار) منتقل شد. پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. سپس، در اتاق تاریک بررسی شد و کلونی‌های نورافشان، به محیط کشت تازه SWA منتقل شد تا کشت خالصی از باکتری‌ها، تهیه شود (Quinto, 2001).

شناسایی جدایه‌ها

ویژگی‌های مورفولوژیکی جدایه‌های نورافشان روی محیط کشت آگاردار SWA بررسی شد. پس از رنگ‌آمیزی گرم، شکل باکتری‌ها و واکنش گرم آنها مطالعه شد. فعالیت کاتالازی و اکسیدازی، تولید اندول،

نورتابی زیستی در موجودات مختلف، متفاوت است. در برخی برای دفاع در برابر شکارچی، در برخی دیگر برای حمله و در برخی از موجودات برای جفت‌یابی صورت می‌گیرد (Haddock *et al.*, 2010). همچنین، سیستم لوسیفیرین-لوسیفراز در موجودات مختلف متفاوت است (Alves *et al.*, 2011). آنزیم لوسیفراز باکتری‌ها به کمک اکسیژن مولکولی، موجب اکسید شدن لوسیفیرین باکتریایی FMNH₂ به همراه یک آلدئید آلیفاتیک زنجیر بلند می‌شود. این واکنش سبب نشر نور سبز-آبی در طول موج حدود ۴۹۰ نانومتر می‌شود که نقش بوم‌شناختی مهمی برای باکتری‌ها دارد. ژن مسؤوول نورافشانی باکتری‌ها، در اپرون *luxCDABE* واقع شده‌است (Bose *et al.*, 2007). *luxAB* آنزیم لوسیفراز ۷۷ کیلو دالتونی را کد می‌کند. *luxA* زیرواحد آلفا کاتالیتیک و *luxB* زیرواحد بتا با عملی ناشناخته را کد می‌کند (Nawaz and Ahmed, 2011). در واقع، *luxB* از دو برابر شدن ژنی *luxA* ایجاد شده‌است. *luxCDE* نیز یک کمپلکس اسید چرب‌ردوکتاز را کد می‌کند که آلدئید مورد نیاز برای واکنش نورافشانی را فراهم می‌کند (Ast *et al.*, 2007). این کمپلکس شامل سه پروتئین: ردوکتاز، سنتتاز و ترانسفراز است. پروتئین‌های دیگر مرتبط با نورافشانی تنها در گونه‌های خاص باکتریایی نورافشان، یافت شده‌اند. باکتری‌های نورافشان شامل جنس‌های دریازی نظیر: *Shewanella*, *Aliivibrio*, *Vibrio* و جنس خاکزی *Photobacterium* هستند (Milburn, 2012). در این پژوهش، باکتری‌های نورافشان از دریای مازندران جداسازی شد و برای شناسایی، از آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده شد. بررسی مولکولی ژن *luxA* به کمک پرایمرهای

عمومی PA و PH استفاده شد (Edwards *et al.*, 1989).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن‌های *luxA* و 16S rDNA

ژنوم باکتری‌های نورافشان جدا شده، با سه گروه پرایمر اختصاصی طراحی شده (جدول ۱) از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بررسی شد. از سه برنامه جداگانه برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، مطابق برنامه زیر استفاده شد:

دمای دناتوراسیون اولیه، ۹۵ درجه سانتیگراد و به مدت ۵ دقیقه بود. سپس ۳۵ چرخه شامل یک دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، یک دقیقه دمای اتصال پرایمر بسته به نوع پرایمر اختصاصی (جدول ۱) و یک دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. در نهایت، برای تکمیل واکنش ساخت DNA دما به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد نگه داشته شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن 16S rDNA نیز برای چهار باکتری جدا شده متعلق به جنس *Photobacterium* مطابق برنامه زیر انجام شد (Edwards *et al.*, 1989):

دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد و به مدت ۵ دقیقه بود. سپس، ۳۵ چرخه شامل یک دقیقه دمای ۹۵، یک دقیقه دمای ۵۰ و یک و نیم دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. در نهایت، برای تکمیل واکنش ساخت DNA دما به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد نگه داشته شد. درستی انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن‌های *luxA* و 16S rDNA با الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بر مایند تأیید شد.

مصرف گلوکز از مسیر تخمیر اسیدهای مخلوط (methyl red test) یا مسیر تخمیر بوتاندیول (voges-proskauer test) و حرکت باکتری‌ها مطابق جدول‌های شناسایی کتاب سیستماتیک باکتریولوژی برگگی، بررسی گردید (Brenner *et al.*, 2004). تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد.

استخراج نوکلئیک‌اسید

برای بررسی مولکولی باکتری‌های جدا شده، DNA ژنومی با روش استاندارد استخراج شد. ابتدا دیواره سلولی باکتری‌ها با هگزادسیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) متلاشی شد. سپس، از محلول فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) برای حذف پروتئین‌ها و قندها استفاده شد. برای رسوب نوکلئیک‌اسید از محلول نمکی پلی اتیلن گلیکول و نیز برای شستشو و حذف سایر ناخالصی‌ها از اتانول خالص استفاده شد. درستی استخراج نوکلئیک‌اسید، با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸ درصد و رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بر مایند بررسی شد (Sambrook and Russell, 2006).

طراحی پرایمرهای اختصاصی ژن *luxA* و پرایمر 16S rDNA

برای طراحی پرایمرهای اختصاصی، توالی ژن *luxA* باکتری‌های نورافشان از بانک اطلاعاتی NCBI تهیه شد و با نرم‌افزار ClustalX درخت دندروگرام ژن *luxA* رسم شد. سپس، به کمک نتایج هم‌ردیف‌سازی (alignment) ژن‌ها در نرم‌افزار ClustalW، توالی پرایمرهای اختصاصی طراحی شد. صحت توالی پرایمرها با نرم‌افزار Gene Runner تأیید شد. توالی پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱ خلاصه شده است. همچنین، برای تکثیر ژن 16S rDNA، از پرایمرهای

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای اختصاصی *luxA* و *16S rRNA* استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، F: پرایمر رفت، R: پرایمر برگشت

پرایمر	توالی (5'→3')	درصد GC	دمای اتصال پرایمر (درجه سانتیگراد)	محصول PCR (bp)
<i>luxA1-F</i>	ATGAAGTTYGGAAATATTTG	۲۵ درصد	۵۶	۷۶۷
<i>luxA1-R</i>	GCATTDACATAWGAGTCATACC	۳۶ درصد		
<i>luxA2-F</i>	TWGGCGTTGCWTCAGAAG	۵۰ درصد	۵۶	۳۹۴
<i>luxA2-R</i>	CRTTKACATCTGGGAAAYTC	۳۷ درصد		
<i>luxA3-F</i>	TGTTGGTATGACTTGATGAAAG	۳۶ درصد	۵۶/۵	۵۱۸
<i>luxA3-R</i>	GCGATACACTCTTCAGGC	۵۶ درصد		
PA-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	۵۰ درصد	۵۶	۱۵۰۰
PH-R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	۶۰ درصد		

کلونی‌های کرم‌رنگ متمایل به سفید بودند. نتایج نشان داد که تمام جدایه‌ها گرم منفی بودند. از نظر مورفولوژی سلول باکتری‌ها، به صورت میله‌ای بلند و کوتاه، برخی کروی و نیز برخی ویبریو شکل یا خمیده بودند. ویژگی مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی برخی جدایه‌های نورافشان جدا شده در جدول ۲ خلاصه شده است.



شکل ۱- کلونی باکتری نورافشان جدایه SG4 جدا شده از دریای مازندران در محیط کشت SWA با نور سبز-آبی
بررسی مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی جدایه‌ها نشان داد که چهار جدایه متعلق به جنس *Vibrio* و پنج جدایه متعلق به جنس *Photobacterium* است. درصد فراوانی باکتری‌های نورافشان به تفکیک جنس‌های شناسایی شده در شکل ۲ مشاهده می‌شود.

پس از تخلیص محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، توالی ژن 16S rDNA توسط شرکت GATC آلمان تعیین شد. نتایج توالی نوکلئوتیدها با نرم‌افزار Chromas مجدداً بررسی شد. شباهت توالی نوکلئوتیدهای ژن 16S rDNA جدایه‌های باکتریایی نورافشان با سایر توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی EzTaxon-e تعیین شد (Kim et al., 2012).

نتایج

تعداد ۹ باکتری نورافشان با محیط کشت اختصاصی SWB و SWA جداسازی شد. کلونی باکتری نورافشان جدا شده با نور سبز-آبی (طول موج ۴۹۰ نانومتر) در شکل ۱ مشاهده می‌شود.

برای شناسایی باکتری‌های نورافشان، ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی از طریق بررسی کلونی، رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی مختلف کاتالاز، اکسیداز، تولید ایندول، حرکت و MR-VP بررسی شد. مورفولوژی کلونی جدایه‌های نورافشان به صورت کرم، شفاف، براق و نرم بود. برخی جدایه‌ها دارای رنگی‌های زرد و یا نارنجی بودند. برخی نیز دارای

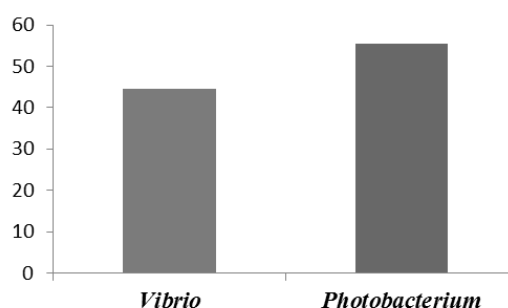
جدول ۲- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی چهار جدایه نورافشان متعلق به جنس *Photobacterium* جدا شده از دریای مازندران

جنس احتمالی	آزمون‌های بیوشیمیایی						مورفولوژی، واکنش گرم	جدایه باکتری
	کاتالاز	اکسیداز	اندول	حرکت	MR	VP		
<i>Photobacterium</i>	+	-	-	-	+	-	میله‌ای کوتاه، گرم منفی	SG4
<i>Photobacterium</i>	+	+	-	-	+	-	میله‌ای، گرم منفی	SG5
<i>Photobacterium</i>	+	+	-	-	+	-	کو کوییدی، گرم منفی	SG8
<i>Photobacterium</i>	+	+	-	-	-	-	میله‌ای کوتاه، گرم منفی	SG21

neighbor joining و با نرم افزار Mega5 رسم شد. موقعیت فیلوژنی این جدایه‌ها با *P. leiognathi* در شکل ۳ نشان داده شد.

برای بررسی مولکولی ژن *luxA*، پرایمرهای اختصاصی طراحی شد. بر اساس توالی ژنی *luxA* اخذ شده از بانک اطلاعاتی و بانرم افزارهای بیوانفورماتیک، درخت دندروگرام رسم شد. نتایج شکل ۴ نشان داد که بر اساس قرابت ژن *luxA* باکتری‌های نورافشان در سه گروه مجزا قرار می‌گیرند. سپس، به کمک نتایج هم‌ردیف‌سازی ژن‌ها، توالی جفت پرایمرهای اختصاصی *luxA1* و *luxA2* و *luxA3* تهیه شد.

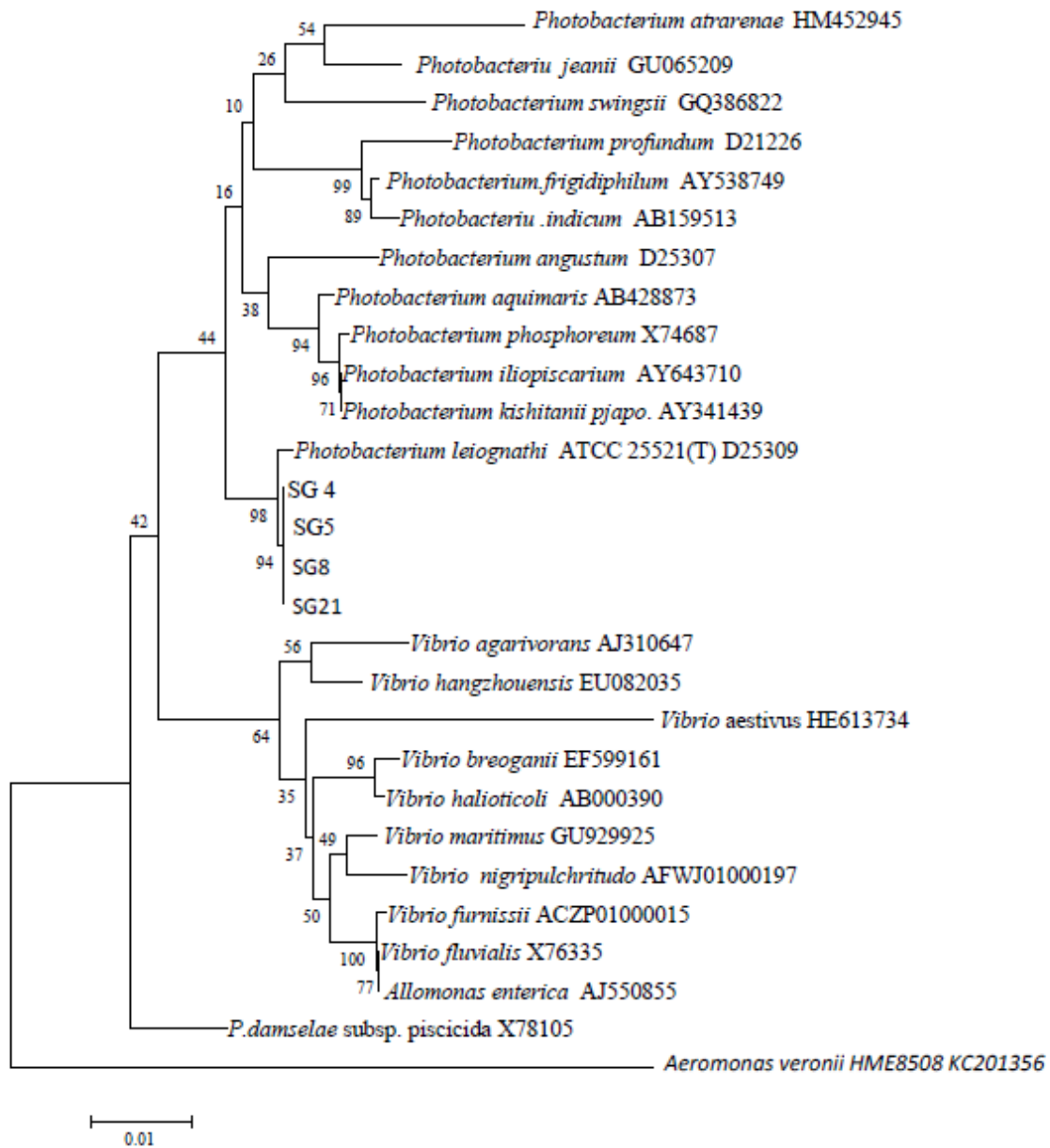
واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن *luxA* به کمک پرایمرهای اختصاصی انجام شد. الکتروفورز ژل آگاروز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن *luxA* باکتری *A. fischeri* (PTCC 1693) در شکل ۵ مشاهده می‌شود. نتایج نشان می‌دهد که پرایمر *luxA1* می‌تواند توالی ژن *Aliivibrio luxA* را شناسایی کند و باند ژن تکثیر شده (اندازه ۷۵۰ bp) در ژل آگاروز مشخص است (شکل ۵).



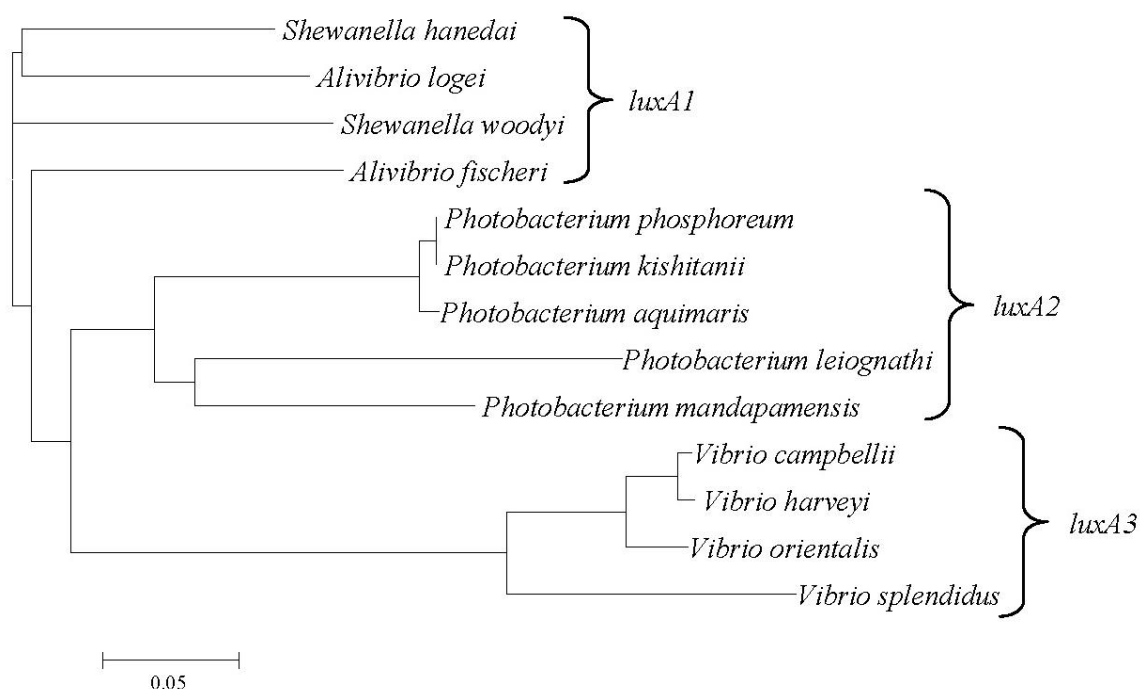
شکل ۲- درصد فراوانی باکتری‌های نورافشان جدا شده بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی

برای تأیید نتایج حاصل از صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی باکتری‌ها، توالی ژن 16S rDNA تعیین شد. به این منظور، چهار جدایه از باکتری‌های شناسایی شده به عنوان جنس *Photobacterium* (جدول ۲)، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن 16S rDNA انجام شد. پس از تعیین توالی آنها، هم‌ساختاری ژن 16S rDNA باکتری‌های نورافشان جدا شده با سایر توالی‌های ثبت شده در بانک اطلاعاتی EzTaxon-e تعیین شد.

نتایج BLAST نشان داد که چهار جدایه نورافشان با ۹۹ درصد هم‌ساختاری، *P. leiognathi* هستند. توالی ژن 16S rDNA باکتری‌های مشابه با نرم افزار ClustalX به همراه باکتری‌های نورافشان جدا شده، هم‌ردیف‌سازی شد. درخت فیلوژنی آن با روش



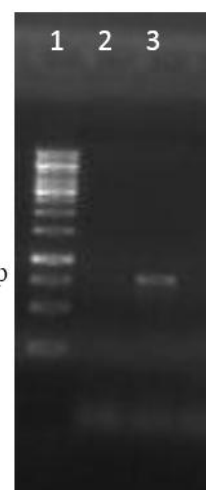
شکل ۳- رابطه فیلوژنی جدایه‌های SG4، SG5، SG8 و SG21 بر اساس توالی ژن 16S rDNA با سایر باکتری‌های نورافشان و غیر نورافشان اخذ شده از بانک اطلاعاتی با روش neighbor joining. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری بوت‌استرپ از ۱۰۰۰ نمونه است. باکتری *Aeromonas veronii* به عنوان out group قرار داده شد.



شکل ۴- گروه‌بندی باکتری‌های نورافشان بر اساس توالی ژن *luxA* به کمک رسم درخت دندروگرام

شکل ۵- الکتروفورز ژل آگاروز ژن *luxA* باکتری *A. fischeri* به کمک پرایمر *luxA1*.

ردیف ۱: خط کش ژنی 1kb؛ ردیف ۲: *Photobacterium* SG4؛ ردیف ۳: *A. fischeri* 750 bp

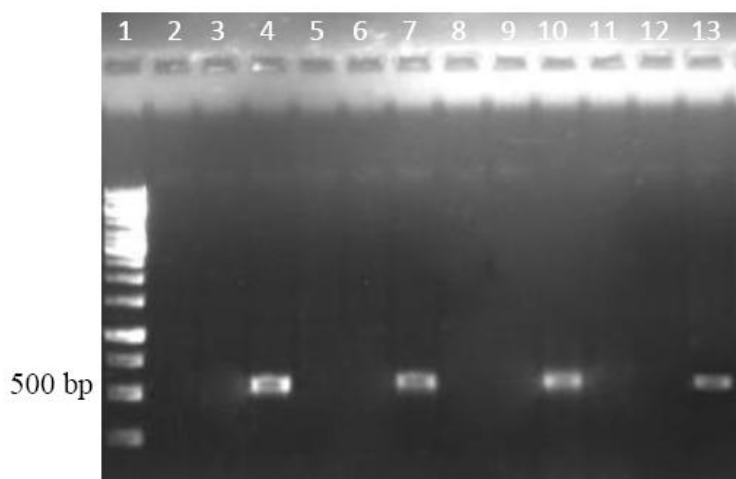


نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نشان داد که ژن *luxA* جدایه‌های متعلق به جنس *Vibrio* (SG1)، (SG2، SG3 و SG9) توسط پرایمر اختصاصی گروه *Vibrio* (*luxA3*) تکثیر شد (شکل ۷). این نتایج نشان می‌دهد که ژن *luxA* باکتری‌های گروه‌بندی شده (شکل ۴)، فقط با پرایمرهای اختصاصی آن گروه، تکثیر می‌یابند.

همچنین، نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن *luxA* جدایه‌های نورافشان متعلق به جنس *Photobacterium* (SG4، SG5، SG8، SG14 و SG21) در شکل ۶ مشاهده می‌شود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز این جدایه‌ها توسط پرایمر *luxA2* انجام شد. البته سایر پرایمرهای اختصاصی، توانایی شناسایی ژن *luxA2* گروه *Photobacterium* را نداشتند (شکل ۶).



شکل ۶- الکتروفورز ژل آگاروز ژن *luxA* جدایه‌های نورافشان متعلق به جنس *Photobacterium* به کمک پرایمر *luxA2* ردیف ۱: خط کش ۱Kb؛ ردیف ۲: واکنش منفی پلیمرز (شاهد)؛ ردیف‌های ۵، ۸، ۱۱، ۱۴ و ۱۷: به ترتیب جدایه‌های SG4، SG5، SG8، SG14 و SG21 با پرایمر *luxA2*؛ ردیف‌های ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵: همان جدایه‌ها با پرایمر *luxA1*؛ ردیف‌های ۴، ۷، ۱۰، ۱۳ و ۱۶: همان جدایه‌ها با پرایمر *luxA3*.



شکل ۷- الکتروفورز ژل آگاروز ژن *luxA* جدایه‌های نورافشان متعلق به جنس *Vibrio* به کمک پرایمر *luxA3* ردیف ۱: خط کش ژنی 1Kb؛ ردیف‌های ۴، ۷، ۱۰ و ۱۳: به ترتیب جدایه‌های SG1، SG2، SG3 و SG9 با پرایمر *luxA3*؛ ردیف‌های ۲، ۵، ۸ و ۱۱: همان جدایه‌ها با پرایمر *luxA1*؛ ردیف‌های ۳، ۶، ۹ و ۱۲: همان جدایه‌ها با پرایمر *luxA2*.

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش، نمونه‌برداری از آب دریای مازندران و از ایستگاه‌های مختلف انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد که ارتباطی مستقیم بین آزمون‌های بیوشیمیایی و تکثیر ژن *luxA* با پرایمرهای اختصاصی وجود دارد. برای تأیید بیشتر توالی‌یابی ژن 16S rDNA

برای چهار جدایه از باکتری‌ها انجام شد که نتایج حاصل از آن نیز با نتایج بالا منطبق بود. بنابراین، می‌توان از نشانگرهای اختصاصی ژن *luxA*، برای تعیین جنس باکتری‌های نورافشان استفاده کرد. Nealson و همکاران (۱۹۹۳) از پروب‌های هیبریدیزاسیون ژن *luxA* برای شناسایی باکتری‌های نورافشان استفاده

کردند. تعدادی از باکتری‌ها، *V. harveyi* و برخی *V. splendidus* شناسایی شدند (Nealson *et al.*, 1993). Yoshizawa و همکاران (۲۰۰۹) نیز دو باکتری نورافشان از خلیج ساگامی ژاپن جداسازی کردند. پس از بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی باکتری‌ها، توالی ژن 16S rDNA و چند ژن خانه‌گزین و نیز ژن *luxA* را تعیین کردند. نتایج مطالعه اخیر، شباهت نزدیکی با *P. kishitanii* را نشان داد اما ارزش هیبریداسیون DNA-DNA این جدایه‌ها با باکتری *P. kishitanii* حدود ۴۲ درصد بود. ویژگی‌های فنوتیپی این جدایه‌ها بسیار شبیه به *P. phosphoreum* و *P. kishitanii* بود ولی به دلیل اختلافات فیزیولوژیکی، *P. aquimaris* نام گرفتند (Yoshizawa *et al.*, 2009). Nawaz و Ahmed (۲۰۱۱) نیز برای انجام تحقیقات خود، با آزمون‌های بیوشیمیایی و نیز توالی‌یابی ژن 16S rDNA، گونه

کردند. تعدادی از باکتری‌ها، *V. harveyi* و برخی *V. splendidus* شناسایی شدند (Nealson *et al.*, 1993). Yoshizawa و همکاران (۲۰۰۹) نیز دو باکتری نورافشان از خلیج ساگامی ژاپن جداسازی کردند. پس از بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی باکتری‌ها، توالی ژن 16S rDNA و چند ژن خانه‌گزین و نیز ژن *luxA* را تعیین کردند. نتایج مطالعه اخیر، شباهت نزدیکی با *P. kishitanii* را نشان داد اما ارزش هیبریداسیون DNA-DNA این جدایه‌ها با باکتری *P. kishitanii* حدود ۴۲ درصد بود. ویژگی‌های فنوتیپی این جدایه‌ها بسیار شبیه به *P. phosphoreum* و *P. kishitanii* بود ولی به دلیل اختلافات فیزیولوژیکی، *P. aquimaris* نام گرفتند (Yoshizawa *et al.*, 2009). Nawaz و Ahmed (۲۰۱۱) نیز برای انجام تحقیقات خود، با آزمون‌های بیوشیمیایی و نیز توالی‌یابی ژن 16S rDNA، گونه

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر ابوالقاسم روحی استادیار پژوهشکده اکولوژی دریای خزر که در جمع‌آوری نمونه‌ها از دریای مازندران همکاری کردند، سپاسگزاری می‌کنیم.

منابع

- Alves, E., Costa, L., Cunha, A., Faustino, M. A., Neves, M. G. P. and Almeida, A. (2011) Bioluminescence and its application in the monitoring of antimicrobial photodynamic therapy. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92: 1115-1128.
- Ast, J. C., Urbanczyk, H. and Dunlap, P. V. (2007) Natural merodiploidy of the *lux*-rib operon of *Photobacterium leiognathi* from coastal waters of Honshu, Japan. *Journal of Bacteriology* 189: 6148-6158.
- Bose, J. L., Kim, U., Bartkowski, W., Gunsalus, R. P., Overley, A. M. and Lyell, N. L. (2007) Bioluminescence in *Vibrio fischeri* is controlled by the redox responsive regulator ArcA. *Molecular Microbiology* 65: 538-553.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R. and Staley, J. T. (2004) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edition, vol. 2, Springer, New York.
- Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M. and Bottger, E. C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 17: 7843-7853.
- Haddock, S. H., Moline, M. A. and Case, J. F. (2010) Bioluminescence in the sea. *Marine Science* 2: 443-493.
- Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H., Yi, H., Won, S., Chun, J. (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database

- with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 716-721.
- Milburn, B. (2012) The function of cyclo (Phe-Pro) in gene expression of *Vibrio harveyi*. MSc thesis, Florida International University, Florida, USA.
- Nawaz, A. and Ahmed, N. (2011) Isolation and characterization of indigenous luminescent marine bacteria from Karachi coast. *Academic Research International* 1: 74-83.
- Nealson, K. H., Wimpee, B. and Wimpee, C. (1993) Identification of *Vibrio splendidus* as a member of the planktonic luminous bacteria from the Persian Gulf and Kuwait region with *luxA* probes. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2684-2689.
- Quinto, E. A. (2001) A simple water toxicity test using *Photobacterium leiognathi*. *Journal of Biological Education* 35: 89-92.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2006) *The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Yoshizawa, S., Wada, M., Kita-Tsukamoto, K., Yokota, A. and Kogure, K. (2009) *Photobacterium aquimaris* sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 1438-1442.

Molecular investigation of *luxA* gene to identify luminescent bacteria in Caspian sea

Mojtaba Mohseni * and Mohaddeseh Salehghamari

Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Abstract

Bioluminescence is a chemical reaction that causes light emission in the living organisms. Luminous bacteria are the most abundant bioluminescent organisms in natural environments. Biochemical tests are used for identification of luminous bacteria. However, molecular characterization of *luxA* gene could be suitable for investigation of luminescent bacteria due to differences in the sequences. In this study, the results of identification of luminescent bacteria were compared to the results of biochemical tests and PCR amplification of *luxA* using designed specific primers. In addition, the results were confirmed by sequencing of 16S rDNA gene in the isolated luminescent bacteria. Samples of sea water were collected from several locations of southern shores of the Caspian sea. Luminous bacteria were isolated using specific cultures SWB and SWA. Then, morphological and physiological characterization of the isolates was identified. Specific primers for amplification of *luxA* were designed and synthesized after classification of luminescent bacteria according to the sequence of *luxA*. Polymerase chain reaction for *luxA* and 16S rDNA genes was performed after nucleic acid extraction of bacteria. Sequencing of 16S rDNA gene was obtained and then phylogenetic tree was constructed. Nine strains of luminescent bacteria were isolated from the Caspian sea. According to the results of biochemical tests, 5 strains belonged to the *Photobacterium* genus and 4 strains belonged to the *Vibrio* genus. Also, *luxA* PCR amplification of *Aliivibrio*, *Photobacterium* and *Vibrio* was done in order to specify primers *luxA1*, *luxA2* and *luxA3*, respectively. In addition, BLAST subroutine of the 16S rDNA sequences revealed that the isolates were most similar to *Photobacterium leiognathi* with 99% homology. Results of isolates determination are according to the biochemical tests, molecular investigation of PCR *luxA* using specific primer and 16S rDNA analyses was correspondent. Therefore, the specific primer of *luxA* could be used for preliminary determination of luminescent bacteria.

Key words: Luminous bacteria, Bioluminescence, Caspian sea, *luxA*

* m.mohseni@umz.ac.ir

Comparison of FTIR and 16S rDNA sequencing methods for identification and taxonomy of methylotroph bacteria

Isaac Zamani, Majid Bouzari * and Giti Emtiazi

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Abstract

Molecular methods such as 16S rDNA sequencing are relatively accurate but are costly and time consuming, therefore new alternative methods have been a matter of interest. FTIR (Fourier Transform Infrared) is one of these methods. It is a physico-chemical method based on measurement of molecular bond vibrations excited by infrared radiation at specific wavelength range. The aim of this study was to assess efficiency of FTIR in identification and taxonomy of methylotroph bacteria (most important group of chlorinated methane derivative degrading bacteria) and comparing it to 16S rDNA sequencing method. Of 30 isolated methylotroph bacteria, 7 were selected. Following amplification of a portion of 16S rDNA gene by PCR and sequencing, a phylogenetic tree was constructed. By FTIR method, transmittance spectra of these bacteria were obtained in infrared region 400-4000 cm⁻¹. FTIR data were analyzed by SPSS software. The dendrogram of FTIR data analysis was very similar to dendrogram of 16S rDNA sequencing. Results showed that FTIR can be used as an identification method but not yet for taxonomy. By introducing a standard method for FTIR data analysis, this method can be considered as an alternative to the 16S rDNA sequencing method.

Key words: Taxonomy, Methylotrophs, 16S rDNA, FTIR

* bouzari@scu.ui.ac.ir

Comparison of PCR-RFLP pattern with sequencing analysis of the ITS region of Hyrcanain's *Tilia*

Hamed Yousefzadeh ^{1*}, Hamid Bina ¹ and Abasalt Hosseinzadeh Colagar ²

¹ Department of Forestry, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

² Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Abstract

Sequencing of ITS region is one of the candidate markers as a DNA barcoding in Plants. Since sequencing technique is expensive and time consuming, we used PCR-RFLP technique and compared the result of these methods (PCR-RFLP and sequencing) to evaluate the efficiency of PCR RFLP technique in recognition of different species of *Tilia* from Hyrcanain forest. Electrophoresis pattern of ITS regions of nine species of *Tilia* were studied by eight restriction enzymes. Results indicated that the *EcoRI* and *BsrBI* did not have restriction site in the genus *Tilia*. Mantel test showed that the dendrogram derived from RFLP and cladogram indicated relatively high congruency ($r=0.57$). PCoA analysis recognized *T. dasystyla*, *T. hyrcana* and *T. rubra* from Hyrcanian's origin, but it could not separate *T. begonifloia* from the other hyrcanian species. In this respect, derived results were similar to sequencing one. In conclusion, with regard to less expensive and less time consuming PCR-RFLP technique and high similarity between its result with sequencing, we recommend this method as a simple and economical method with relatively high efficiency studying plant phylogeny.

Key words: Internal Transcribed Spacer (ITS), Restriction fragment length polymorphism, Restriction enzyme, Phylogeny

* h.yousefzadeh@modares.ac.ir

Numerical taxonomy of the genus *Matthiola* (Brassicaceae) in Northeast of Iran based on morphological traits

Mozhgan Rashid Taranloo ¹, Jamil Vaezi ^{2*}, Hamid Ejtehadi ¹, Farshid Memariani ³
and Mohammad Reza Joharchi ³

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

² Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³ Department of Botany, Research Centre for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract

The genus *Matthiola* R. BR. (Brassicaceae) consists of 48 species in the Iranian plateau, of which only seven species are distributed in northeast of Iran. Six species were collected from the region under study including *M. afghanica*, *M. alyssifolia*, *M. chenopodiifolia*, *M. chorassanica*, *M. dumulosa* and *M. farinosa*. Two species, *M. flavida* and *M. revoluta* were recorded for the first time in this study. Some specimens of an unknown taxon entitled *Matthiola* sp. are also collected in the region and included in the present study. In this study, we tried to use a set of morphologically informative characters which could determine species boundaries and also provide appropriate identification key to the genus in the northeast of Iran. 71 morphological features including quantitative and qualitative were examined on 68 herbarium and field-collected accessions followed by statistical analyses. The results of the univariate analysis indicated that "presence/absence of trichome on the stem and leaf" and "presence/absence of glandular trichomes on the sepal and pedicel" did not significantly differentiate the species and they were excluded from the subsequent analysis. The results of multivariate analysis showed that the species under study were grouped within three groups. First group included specimens of the species *M. alyssifolia*, the species *M. afghanica*, *M. chenopodiifolia*, *M. dumulosa*, *M. farinosa*, *M. flavida* and *Matthiola* sp. were placed in second group and third group included specimens of the two species *M. chorassanica* and *M. revoluta*.

Key words: Principal Component Analysis (PCA), Brassicaceae, Morphology, *Matthiola*, Northeast of Iran

* j.vaezi@scu.ac.ir

**Revision of the *Sargassum* species (Sagassaceae, Phaeophyceae)
from Acanthocarpicae and Malacocarpicae sections
in Iranian southern coasts**

Masoumeh Shams, Saeed Afsharzadeh * and Gholamreza Balali Dehkordi

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Abstract

Sargassum C. Agardh (Sagassaceae, Phaeophyceae) is a brown algae in the Iranian southern coasts which they showed high density along the subtidal zone of area. In this study, the features of four species of Acanthocarpicae (*S. crassifolium* J. Agardh and *S. oligocystum* Montagne) and Malacocarpicae (*S. baccularia* (Mertens) C. Agardh, *S. henslowianum* C. Agardh) were described. Species within the Malacocarpicae section were typified by having smooth receptacles, whereas those in the Acanthocarpicae section had spiny receptacles. Also, presence of discoid to conical holdfast, elongated to lanceolate leaves and with wavy to denticulate margin were the main characters of these sections. *S. baccularia* was characterized by less spiny branches compared to other species. *S. crassifolium* and *S. oligocystum* had flattened primary branches, their leaves mostly wavy or denticulate at margins, with leaf-like mucronate at vesicles apex and racemose to paniculate receptacles.

Key words: Taxonomy, *Sargassum*, Iranian southern coasts, Morphology

* s.afshar@biol.ui.ac.ir

**Distribution, density and biological breeding of
white wing pheasant (*Phasianus colchicus principalis*, Sclater, 1885)
in Northeast of Iran**

Nasrin Kayvanfar and Mansour Aliabadian *

Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract

Common pheasant (*Phasianus colchicus*, Linnaeus, 1758) is an endemic naturally distributed in the Palearctic regions. White wing pheasant (*P. c. principalis*) is distributed from Turkmenistan and north of Afghanistan along to Harir-Rud river in northeast of Iran. This study was the first attempt to determine the geographical range, density and breeding biology of white wing pheasant populations in northeast of Iran. To do so, 36 stations were defined in the breeding range of the species in two cities, namely Sarakhs and Dargaz in northeast of Iran. The breeding behaviors including egg lying, hatching and feeding behavior of chicks' were monitored and photographed using camera traps in 14 active nests in 10 stations. Collected data showed that white wing pheasant had a simple nest shape; breeding season started in early April; hatching began end of May and lasted 24 ± 1 days (based on 14 active nests) and finally enjoyed little parental caring, particularly for the males. Comparative morphometrical data for eggs (length and width), nest and clutch size showed that there was a significant variation between the studied populations ($P < 0.05$, ANOVA), in which the populations could be separated based on discriminant function analysis and the euclidean eendrogram. Comparison of morphometrical data of eggs in captive and wild nests showed that there was a significant length variation between them ($P < 0.05$).

Key words: Distribution, Breeding, Discriminant function analysis, *Phasianus colchicus principalis*

* aliabadian@um.ac.ir

Introduction of some Odonata species (Insecta) from northern Iran

Elham Yoosefi Lafooraki ¹, Fatemeh Rasekhi ¹ and Masoumeh Shayanmehr ^{2*}

Department of Plant Protection, Faculty of Crop Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

Abstract

Odonata are an order belonging to Paleoptera which are divided into three suborders, Anisoptera, Anisozygoptera and Zygoptera. In order to investigate Odonata fauna from Mazandaran province, adult insects were collected from several different natural habitats and were identified. The specimens were included 13 species from 10 genera belonging to seven families. Seven species belonged to Anisoptera and six species belonged to Zygoptera. The species that were marked by asterisk were recorded for the first time for Mazandaran fauna. The collected and identified species are listed as below:

**Anax parthenope*, **Calopteryx splendens intermedia*, *Calopteryx splendens orientalis*, **Coenagrion vanbrinckae*, *Crocothemis erythraea*, **Epallage fatime*, **Ischnura pumilio*, **Lestes virevs*, **Libellula depressa*, **Orthetrum albistylum*, *Orthetrum sabina*, **Platycnemis dealbata*, *Sympetrum fonscolombi* and *Sympetrum striolatum*.

Key words: Anisoptera, Paleoptera, Zygoptera, Odonata, Iran

* m.shayanmehr@sanru.ac.ir

**Genetic structure of Mosul bleak
(*Alburnus mossulensis* Heckel, 1843) using microsatellite marker
in Tigris basin**

Zahra Shafee¹, Salar Dorafshan^{1*}, Yazdan Keivany¹ and Seyed Ahmad Qasemi²

¹ Department of Fishery, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

² Persian Gulf Research Center, Persian Gulf University, Bushehr, Iran

Abstract

Genetic structure of Mosul bleak (*Alburnus mossulensis* Heckel, 1843) of Tigris basin was investigated using 4 microsatellite loci (BL1-2b, BL1-98, CypG24 and Rser10) on fish collected from different populations of rivers including Konjancham, Kashgan, Doroud, Dopolan and Davoud Arab. Thirty specimens from each river with the exception of 25 specimens from Davoud Arab were collected. PCR amplification showed 43 alleles in total, averaging 10.75 alleles per locus. Allele sizes at CypG24, BL1-2b, BL1-98 and Rser10 loci were in the range of 138-215, 141-180, 272-300, 176-240 bps, respectively. The expected heterozygosity ranged from 0.79 in Davoud Arab river to 0.84 in Konjancham and Kashgan rivers with an average of 0.825. Observed heterozygosity ranged from 0.69 in Konjancham river to 0.81 in Kashgan river with an average of 0.75. Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were found to be at BL1-98, BL1-2b and CypG24 loci in all populations and Rser10 in Davoud Arab population ($P < 0.001$). The overall F_{ST} mean values between populations and basins were 0.02 and 0.0071, respectively. The analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that the percent of variance among and within populations were 17.6 and 82.4, respectively. The genetic similarity and distance indices were in the range of 0.696-0.894 and 0.111-0.34, respectively. Little but meaningfully significant genetic differentiation was observed among different stations ($P < 0.05$). For deeper understanding of population structure of Mosul bleak, studying of more microsatellite markers is recommended.

Key words: Mosul bleak, *Alburnus mossulensis*, Microsatellite, Genetic diversity, Genetic differentiation

* sdorafshan@cc.iut.ac.ir

**Geometric and morphometric analysis of fish scales
to identity genera, species and populations
case study: the Cyprinid family**

Seyedeh Narjes Tabatabaei¹, Soheil Eagderi^{1*}, Iraj Hashemzadeh Segherloo²
and Asghar Abdoli³

¹ Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

² Department of Fisheries and Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences,
Shahrekord University, Shahrekord, Iran

³ Department of Biodiversity and Ecosystem Management, Environmental Sciences Research Center,
Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Abstract

Using fish scale to identity species and population is a rapid, safe and low cost method. Hence, this study was carried out to investigate the possibility of using geometric and morphometric methods in fish scales for rapid identification of species and populations and compare the efficiency of applying few and/or high number of landmark points. For this purpose, scales of one population of *Luciobarbus capito*, four populations of *Alburnoides eichwaldii* and two populations of *Rutilus frisii kutum*, all belonging to cyprinid family, were examined. On two-dimensional images of the scales 7 and 23 landmark points were digitized in two separate times using TpsDig2, respectively. Landmark data after generalized procrustes analysis were analyzed using Principal Component Analysis (PCA), Canonical Variate Analysis (CVA) and Cluster Analysis. The results of both methods (using 7 and 23 landmark points) showed significant differences of the shape of scales among the three species studied ($P < 0.001$), but no significant differences among their populations ($P > 0.05$). The results also showed that few number of landmarks could display the differences between scale shapes. According to the results of this study, it could be stated that the scale of each species had unique shape patterns which could be utilized as a species identification key.

Key words: Landmark-based morphometrics, Scale shape, Kutum fish, Bulatmai barbel, Riffle minnow

* soheil.eagderi@ut.ac.ir

Taxonomy and Biosystematics
5th Year, No. 17, Winter 2013
ISSN (Print): 2008-8906
ISSN (Online): 2322-2190

Contents

- **Geometric and morphometric analysis of fish scales to identify genera, species and populations case study: the Cyprinid family** 1
Seyedeh Narjes Tabatabaei, Soheil Eagderi, Iraj Hashemzadeh Segherloo and Asghar Abdoli
- **Genetic structure of Mosul bleak (*Alburnus mossulensis* Heckel, 1843) using microsatellite marker in Tigris basin** 2
Zahra Shafee, Salar Dorafshan, Yazdan Keivany and Seyed Ahmad Qasemi
- **Introduction of some Odonata species (Insecta) from northern Iran** 3
Elham Yoosefi Lafooraki, Fatemeh Rasekhi and Masoumeh Shayanmehr
- **Distribution, density and biological breeding of white wing pheasant (*Phasianus colchicus principalis*, Sclater, 1885) in Northeast of Iran** 4
Nasrin Kayvanfar and Mansour Aliabadian
- **Revision of the *Sargassum* species (Sagassaceae, Phaeophyceae) from Acanthocarpicae and Malacocarpicae sections in Iranian southern coasts** .. 5
Masoumeh Shams, Saeed Afsharzadeh and Gholamreza Balali Dehkordi
- **Numerical taxonomy of the genus *Matthiola* (Brassicaceae) in Northeast of Iran based on morphological traits** 6
Mozhgan Rashid Taranloo, Jamil Vaezi, Hamid Ejtehadi, Farshid Memariani and Mohammad Reza Joharchi
- **Comparison of PCR-RFLP pattern with sequencing analysis of the ITS region of Hyrcanain's *Tilia*** 7
Hamed Yousefzadeh, Hamid Bina and Abasalt Hosseinzadeh Colagar
- **Comparison of FTIR and 16S rDNA sequencing methods for identification and taxonomy of methylotroph bacteria** 8
Isaac Zamani, Majid Bouzari and Giti Emtiazi
- **Molecular investigation of *luxA* gene to identify luminescent bacteria in Caspian sea** 9
Mojtaba Mohseni and Mohaddeseh Salehghamari

Referees to this issue (5th Year, No. 17, Winter 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):

Mr. Mohammad Reza Ashrafzadeh, Khorramshahr University of Marine Science and Technology

Dr. Majid Askari Siyahooei, Iranian Research Institute of Plant Protection

Dr. Keivan Beheshti Maal, Islamic Azad University, Falavarjan Branch

Dr. Firouzeh Bordbar, Shahid Bahonar University of Kerman

Dr. Rahman Emamzadeh, University of Isfahan

Dr. Zahra Etemadifar, University of Isfahan

Dr. Marzieh Beygom Faghir, University of Guilan

Mr. Hossein Heidari, Iranian Research Institute of Plant Protection

Dr. Saeed Keyvanshokoo, Khorramshahr University of Marine Science and Technology

Dr. Moj Khaleghi, Shahid Bahonar University of Kerman

Dr. Hossein Madani, University of Isfahan

Dr. Seyed Masoud Madjdzadeh, Shahid Bahonar University of Kerman

Dr. Houshang Nosrati, University of Tabriz

Dr. Hadi Pourbagher, University of Tehran

Dr. Mehdi Rahim Malek, Isfahan University of Technology

Dr. Fateh Rahimi, University of Isfahan

Dr. Saber Sadeghi, University of Shiraz

Dr. Arash Shakouri, Chabahar Maritime University

Dr. Majid Sharifi Tehrani, University of Shahrekord

Dr. Neda Soltani Tirani, Shahid Beheshti University

Dr. Ali Soltanpour, Researcher

Dr. Iman Sourinezhad, University of Hormozgan

Dr. Fatemeh Tabatabaei Yazdi, Ferdowsi University of Mashhad

Dr. Habib Zare, Mazandaran Agricultural and natural Resources Research Center

Taxonomy and Biosystematics

5th Year, No. 17, Winter 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

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.

Taxonomy and Biosystematics is indexed and listed in these Databases:

TBJ electronic database	http://uijs.ui.ac.ir/tbj
EBSCOhost databases	http://www.ebscohost.com
DOAJ: Directory of Open Access Journals	http://www.doaj.org
Index Copernicus (IC Journal Master List)	http://journals.indexcopernicus.com
ISC: Islamic World Science Citation center	http://www.isc.gov.ir
Magiran: Journals database	http://www.magiran.com
SID: Scientific Information Database	http://www.sid.ir
Ulrichsweb: global serials directory	http://ulrichsweb.serialssolutions.com

Publication and Lithography: University of Isfahan Publications

Publisher: University of Isfahan

Published in: Winter 2013

Taxonomy and Biosystematics

5th Year, No. 17, Winter 2013

**Published by
University of Isfahan Research Center**