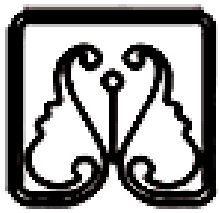
بسم الله الرحمن الرحیم



دانشگاه گیلان

دانشکده منابع طبیعی

پایان نامه کارشناسی ارشد

عنوان:

مقایسه مورفولوژیکی و مولکولی رفتگرماهیان‌خاردار (Cobitidae) در حوضه جنوبی دریای خزر و حوضه دجله

از:

ابوذر حبیبی

اساتید راهنما:

دکتر حمیدرضا اسماعیلی

دکتر مجیدرضا خوش‌خلق

استاد مشاور:

دکتر سید حامد موسوی ثابت

اسفند ماه ۱۳۹۲

تشکر و قدردانی:

اکنون که به لطف خداوند مراحل نگارش این پایان نامه به اتمام رسیده است برخود لازم می‌دانم که از صمیم قلب مراتب تقدیر و تشکر خود را از استادان فرهیخته جناب آقای دکتر سید حامد موسوی ثابت، دکتر حمیدرضا اسماعیلی و دکتر مجیدرضا خوش‌خلق که عهده‌دار مسئولیت راهنمایی این‌جانب در پژوهش حاضر بوده‌اند ابراز دارم که بی‌شک این پایان نامه حاصل هدایت، راهنمایی و نظارت مستمر ایشان بوده است. از اساتید محترم جناب آقای دکتر جاوید ایمانپور نمین و دکتر آریا باباحانی که زحمت داوری این پایان نامه را متقبل شدند نیز سپاسگزاری می نمایم.

از جناب آقای مهندس مجید موسی‌پور مسئول آزمایشگاه بیولوژی آبزیان گروه شیلات که در انجام مراحل مختلف این پایان نامه با این جانب همکاری نمودند قدردانی می‌نمایم.

از تمام دوستانم؛ زهرا فراهانی، گلنار صیادی، عادله حیدری، حمیدرضا باقرپور ریکنده، یوسف احمدی، محمد مرادیانی، آرام حسینی و دانشجویان کارشناسی ارشد شیلات گرایش‌های تکثیر و پرورش آبزیان و بوم شناسی آبزیان ورودی ۱۳۹۰ دانشگاه گیلان و سایر دوستانم که به نحوی در انجام مراحل مختلف پایان‌نامه با این‌جانب همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

ابوذر حبیبی

زمستان ۱۳۹۲

چکیده

عنوان: مقایسه مورفولوژیکی و مولکولی رفتگرماهیان‌خاردار (Cobitidae) در حوزه جنوبی دریای خزر و حوزه دجله

نام دانشجو: ابوذر حبیبی

رفتگرماهیان‌خاردار *Cobitis* از ماهیان غالب در حوزه جنوبی دریای خزر می‌باشند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد این ماهیان در قسمت‌های مختلف حوزه جنوبی دریای خزر و حوزه دجله از لحاظ جغرافیایی انشقاق یافته و به گونه‌های جدید تبدیل شده‌اند اما اطلاعات ریخت سنجی و ژنتیکی بسیار کمی وجود دارد که نشان دهنده تمایز این گونه‌ها باشد. این مطالعه به منظور بررسی تنوع و تمایز رفتگرماهیان‌خاردار در رودخانه‌های حوزه جنوبی دریای خزر و حوزه دجله طراحی شده است. در مجموع ۱۰۶ قطعه ماهی که ۳۱ قطعه آن مربوط به رودخانه گیسوم، ۲۲ قطعه آن مربوط به رودخانه سفیدرود، ۸ قطعه مربوط به رودخانه ولمه‌رود، ۱۳ قطعه مربوط به رودخانه سیاهرود، ۲۳ قطعه مربوط به رودخانه تالار و ۷ فطعه مربوط به حوزه دجله توسط دستگاه الکتروشوکر صید گردیدند. ۳۴ صفت ریخت سنجی مطلق و mtDNA توسط مارکر سینوکروم b بررسی شدند. در مورد داده‌های ریخت سنجی پس از استانداردسازی داده‌ها از آنالیزهای تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA)، تابع متمایز کننده (DFA) و رسم دندروگرام استفاده گردید. نتایج مربوط به آنالیز تابع متمایز کننده (DFA) نشان داد، جمعیت رفتگرماهیان‌خاردار در ایستگاه‌های واقع در حوزه جنوبی دریای خزر به میزان ۸۴/۹ درصد از یکدیگر انشقاق یافته‌اند و جمعیت‌های رودخانه گیسوم، سفیدرود، ولمه‌رود، سیاهرود و تالار به ترتیب به میزان ۷۷/۴، ۷۷/۳، ۱۰۰، ۱۰۰ درصد و ۸۹/۵ درصد به درستی گروه‌بندی شده‌اند. نتایج آنالیز تجزیه به مولفه‌های اصلی نشان داد، جمعیت‌های واقع در حوزه جنوبی دریای خزر در ۶ فاکتور به طور معنی‌داری از یکدیگر متمایز گشته‌اند و نمودار پراکنش بر اساس مولفه‌های اول و دوم نیز، این دو جمعیت را از یکدیگر متمایز نشان داد. رسم دندروگرام UPGMA بر اساس فاصله اقلیدسی نیز جمعیت ایستگاه‌های واقع در حوزه جنوبی دریای خزر را از یکدیگر متمایز نموده است. در این مطالعه رودخانه‌های سفیدرود و ولمه‌رود به عنوان زیستگاه‌های جدید برای گونه *Cobitis keyvani* معرفی شد. براساس مطالعات مولکولی سیتوکروم b چهار جمعیت متمایز از رفتگرماهیان‌خاردار در مناطق مطالعه شده به دست آمد. اولین گروه متعلق به جمعیت حوزه دجله (*Cobitis avicenna*) می‌باشد که به عنوان گونه جدا در درخت‌های فایلوژنی رسم شد. جمعیت رودخانه گیسوم (*Cobitis* sp.) به عنوان گونه خواهری برای جمعیت‌های رودخانه‌های سیاهرود (*Cobitis faridpaki*) و تالار (*Cobitis keyvani*) به دست آمد. *Cobitis keyvani* و *Cobitis faridpaki* بر اساس مطالعات ژنتیکی به صورت گونه‌های همجا (Sympatric) در رودخانه‌های سیاهرود و تالار یافت شدند.

واژه های کلیدی: رفتگرماهی‌خاردار، *Cobitis*، تنوع و تمایز ژنتیکی، حوزه جنوبی دریای خزر، الگوی پراکنش

فهرست مطالب

چکیده.....ب

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه ۲

۱- ۱-۱- اهمیت و ضرورت انجام تحقیق.....۳

۱-۱-۲- اهداف و فرضیه‌های تحقیق.....۳

۱-۲- کلیات.....۴

۱-۲-۱- رده‌بندی رفتگرماهیان‌خاردار ۴

۱-۲-۲- مشخصات رفتگرماهیان‌خاردار ۴

۱-۲-۳- پراکنش.....۴

۱-۲-۴- اکولوژی.....۵

۱-۲-۵- طول عمر و بلوغ جنسی.....۶

۱-۲-۶- تغذیه.....۶

۱-۲-۷- ارزش اقتصادی.....۶

۱-۳- نشانگرها.....۶

۱-۳-۱- نشانگرهای مورفولوژیک.....۷

۱-۳-۱-۱- صفت مورفومتریک و مریستیک.....۷

فهرست مطالب

۱-۳-۲-نشانگرهای مولکولی DNA و mtDNA ۸

۱-۳-۲-۱-ساختمان میتوکندری ۹

۱-۳- ۲-۲- تقسیم بندی ژن‌های mtDNA ۱۰

۱-۳-۲-۳- نشانگرهای DNA میتوکندریایی (mtDNA) ۱۰

۱-۴- تنوع زیستی و تنوع ژنتیکی ۱۲

۱-۴-۱- اهمیت مطالعه تنوع زیستی ۱۳

۱-۴-۲- روش‌های حفاظت از تنوع زیستی ۱۴

۱-۵- انشقاق گونه‌ها ۱۴

۱-۵-۱- عوامل موثر بر گونه‌زایی ۱۵

۱-۶- مروری بر منابع ۱۷

۱-۶-۱- مروری بر مطالعات مورفولوژِک و مولکولی انجام شده در ایران ۱۷

۱-۶-۲- مروری بر مطالعات مورفولوژیک و مولکولی انجام شده در نقاط مختلف جهان ۱۸

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱- منطقه مورد مطالعه ۲۱

۲-۲- روش نمونه‌برداری ماهی ۲۲

۲-۳- مطالعات مورفومتریک ۲۲

۲-۴- مطالعات مریستیک ۲۳

۲-۵- آنالیز آماری داده‌های مورفومتریک و مریستیک..... ۲۴

۲-۶- مطالعات ژنتیکی..... ۲۶

۲-۶-۱- نمونه‌برداری از ماهیان..... ۲۶

۲-۶-۲- استخراج DNA..... ۲۶

۲-۶-۳- ارزیابی کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز..... ۲۸

۲-۶-۴- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)..... ۲۹

۲-۶-۵- آنالیز داده‌های ژنتیکی..... ۳۰

فصل سوم: نتایج

۳-۱- صفات ریخت سنجی..... ۳۳

۳-۱-۱- صفات ریخت سنجی مربوط به نمونه‌های حوزه جنوبی دریای خزر..... ۳۳

۳-۱-۲- صفات شمارشی مربوط به نمونه‌های حوزه جنوبی دریای خزر و حوزه دجله..... ۴۳

۳-۱-۳- صفات ریخت سنجی مربوط به نمونه‌های حوزه دجله..... ۴۴

۳-۲- مطالعات مولکولی..... ۴۵

فصل چهارم: بحث و نتجه گیری

۴-۱- بررسی خصوصیات مورفومتریک و مریستیک..... ۵۰

۴-۲- مطالعات ژنتیکی..... ۵۵

۴-۳-نتیجه گیری کلی..... ۶۱

۴-۴- پیشنهادها..... ۶۲

فصل پنجم: منابع و ماخذ..... ۶۳

فهرست تصاویر

شکل ۱-۱- ساختمان میتوکندری و اجزای آن..... ۹

شکل ۱-۲- نقشه ژنی mtDNA با جایگاه و موقعیت تمامی ژن‌ها، اقتباس از (Hallerman, 2003)..... ۱۲

شکل۲-۱: نقشه موقعیت ایستگاه‌های نمونه برداری واقع در حوزه جنوبی دریای خزر و حوزه دجله ۲۱

شکل۲- ۲: پارامتر های ریخت سنجی رفتگر ماهی خاردار این فواصل بر اساس مطلعات Mousavi-Sabet و همکاران (۲۰۱۰ و ۲۰۱۱) بر روی رفتگر ماهی ماهیان انتخاب گشته اند..... ۲۲

شکل۲-۳- دستگاه الکتروفورز افقی و منبع مولد نیروی برق..... ۲۹

شکل ۳-۱- Scree plot عامل‌های صفات ریخت سنجی مطلق جمغیت رفتگرماهیان‌خاردار در حوزه جنوبی دریای خزر..... ۴۰

شکل ۳-۲- پراکنش افراد بر اساس روابط عامل‌های استخراجی اول و دوم در مورد صفات ریخت سنجی برای جمیت ماهیان *Cobitis* در حوزه جنوبی دریای خزر..... ۴۰

شکل ۳-۳- دندروگرام بر اساس فواصل اقلیدسی در مورد افراد جمعیت‌های زفتگرماهیان‌خاردار در حوزه جنوبی دریای خزر..... ۴۲

شکل۳-۴- دندروگرام UPGMA رسم شده بر اساس نتایج mtDNA جمعیت‌های رفتگرماهیان‌خاردار *Cobitis* در حوزه جنوبی دریای خزر و حوزه دجله..... ۴۶

شکل۳-۵- دندروگرام UPGMA رسم شده بر اساس نتایج mtDNA جمعیت‌های رفتگرماهیان‌خاردار *Cobitis* در حوزه جنوبی دریای خزر و حوزه دجله..... ۴۷

فهرست جداول

جدول ۱-۱- طبقه‌بندی ژن‌های DNA میتوکندریایی برای تاس‌ماهیان (Meyer and Zardoya, 1996):..... ۱۰

جدول ۱-۲- طبقه‌بندی ژن‌های DNA میتوکندریایی برای ماهیان استخوانی (Miya and Nishida, 2000):.....۱۰

جدول ۲-۱- توالی و نوع پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر DNA ژنومی در PCR..... ۲۹

جدول ۲-۲- غلظت مواد مصرفی برای هر واکنش PCR..... ۳۰

جدول ۲-۳- چرخه‌های حرارتی استفاده شده جهت PCR.....۳۰

جدول ۳-۱- ساختار سنی رفتگرماهیان‌خاردار بر اساس تفکیک جنسیت در حوزه جنوبی دریای خزر..... ۳۴

جدول ۳-۲- میانگین و خطای معیار صفات ریخت سنجی نسبی برای رفتگرماهیان‌خاردار در حوزه جنوبی دریای ۳۵

جدول ۳-۳- نتایج ANOVA در مورد دو شکلی جنسی صفات ریخت سنجی رفتگرماهیان‌خاردار در حوزه جنوبی دریای خزر..... ۳۶

جدول ۳-۴- نتایج ANOVA در مورد اختلاف مشاهده شده در صفات ریخت سنجی نمونه‌های مطالعه شده در حوزه جنوبی دریای خزر..... ۳۷

جدول ۳-۵- مقادیر ویژه، درصد واریانس و درصد واریانس تجمعی عوامل استخراجی صفات ریخت سنجی جمعیت‌های رفتگرماهیان‌خاردار در حوزه جنوبی دریای خزر..... ۳۸

جدول ۳-۶- صفات ریخت سنجی مطلق طبقه بندی شده در فاکتوهای اول تا ششم و مقادیر آن‌ها در جمعیت‌های رفتگرماهیان-خاردار در حوزه جنوبی دریای خزر..... ۳۹

فهرست جداول

جدول ۳-۷- گروه‌بندی افراد بر اساس نتایج آزمون تابع متمایز کننده در مورد صفات ریخت سنجی مطلق در جمعیت‌های رفتگرماهیان‌خاردار در حوزه جنوبی دریای خزر..... ۴۱

جدول ۳-۸- صفت شمارشی جمعیت‌های ماهیان *Cobitis* در حوزه جنوبی دریای خزر و حوزه دجله..... ۴۳

جدول ۳-۹- مقایسه صفات شمارشی جمعیت‌های *Cobitis* در ایستگاه‌های حوزه جنوبی دریای خزر با استفاده از آزمون کراسکال والیس (Kruskal Wallis Test)..... ۴۳

جدول ۳-۱۰- میانگین و خطای استاندارد صفات ریخت سنجی نسبی نمونه‌های جمع آوری شده از حوزه دجله..... ۴۴

جدول ۳-۱۱- فاصله ژنتیکی مشاهده شده بر اساس آنالیز مولکولی mtDNA برای جمعیت Cobitits در حوزه دریای خزر و حوزه دجله..... ۴

Summery

Title: Morphological and molecular comparisons of spined loaches (Cobitidae) in the Southern Caspian Sea basin and Tigris basin

Author: Abouzar Habibbi

Spined loach, *Cobitis* sp. is a predominant fish in the river systems of the southern Caspian Sea basin. Although there is evidence of the geographical divergence of this taxon, but littel information is available on morphological and molecular differences within the populations. This study was designed to evaluate variation and differentiation of *cobitis* population in the southern Caspian Sea basin and Tegris basin. Cytocrom b markers and traditional morphometric measurements were used to investigate the hypothesis of population fragmentation of *Cobitis* sp. among the rivers of southern Caspian Sea basin and Tigris basin. Data were standardized and analysed with principal component analysis, discriminant function analysis and clustering analisis. In discriminate function analysis, the proportion of individuals correctly classified into their original groups was 84.9% indicating that these populations are highly divergent. The proportion of individuals correctly classified into their original groups were 77.4%, 77.3%, 100%, 100% and 89.5% for *Cobitis* sp. (Gisum River), *Cobitis keyvani* (Sefidroud River), *C. keyvani* (Valmeroud), *Cobitis faridpaki* (Siahroud River) and *C. keyvani* (Talar River), respectively. Principal component analysis showed pupolation of southern Caspian Sea basin in 6 factors distinguished from echother. Clustering based on Euclidean distances among groups of centroids using an UPGMA also indicated that five pupolation of *Cobitis* in the southern Caspian Sea basin were clearly distinct from eachother. Also Valmeroud and Sefidroud rivers are found as two new habitats for *C. keyvani* in the region. According to molecular result four populations of *cobitis* population were distinguished. The first species was belonging to Tigris basin (*Cobitis avesnna*). Gisum population (*Cobitis* sp.) was defained as sister species for *Cobitis faridpaki* and *Cobitis keyvani* populations. *Cobitis faridpaki* and *Cobitis kivani* observed as sympatric population in the southern Caspian Sea basin.

Key words: Spined loach, *Cobitis*, molucular differentiation, southern Caspian Sea basin, distirbutation pattern

فصل اول:

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

تاکسونومی روشی برای طبقه‌بندی موجودات برروی کره‌ی زمین می‌باشد که پایه و اساس درخت فایلوژنی جانداران را می‌سازد (Wilson, 2004). درخت فایلوژنی اطلاعات ضروری و مورد نیاز برای علوم اکولوژی و حفاظت از محیط زیست را فراهم کرده و آن‌ها را در دسترس افراد قرار می‌دهد، با وجود این بسیاری از بخش‌های تنوع زیستی برای انسان نشناخته باقی مانده است (Wilson, 2004). صفات مورفومتریک و مریستیک، ویژگی‌های قابل اندازه‌گیری می‌باشند و برای جدا کردن جنس‌ها و گونه‌های نزدیک و حتی جمعیت‌های داخل آن‌ها استفاده می‌شود (Cadrin, 2000). اختلافات ریخت‌شناسی بین جمعیت‌ها یا گونه‌ها معمولا به صورت بیان شکل کلی بدن و یا شکل‌های تشریحی خاص توضیح داده می‌شود، برای بیان اختلاف موجود در بین افراد از لحاظ کمی، صحیح‌تر آن است که اندازه گیری‌های مختلفی درباره آن‌ها انجام گرفته و سپس این اندازه‌ها با تجزیه و تحلیل‌های آماری بررسی شوند (Schreck and Moyel, 1990). تغیرات ریختی موجودات نه‌تنها تحت کنترل ژنتیک آن‌ها می‌باشد، بلکه از تغییرات محیطی نیز متاثر می‌شود، از این‌رو رابطه متقابل بین ژنتیک و محیط یکی از محدودیت‌های استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی در تمایز بین گونه‌ها و جمعیت‌ها می‌باشد (Clayton, 1981). بنابراین وجود اختلافات ریختی موجود بین جمعیت‌ها نمی‌تواند گواهی بر اختلافات ژنتیکی آن‌ها نیز باشد (Turan, 1999). در سال‌های اخیر روش‌های مولکولی برای مطالعه تنوع ژنتیکی ماهیان به طور گسترده‌ای مورد توجه قرار گرفته است. پیشرفت در روش‌های مولکولی دسترسی به مارکرهای مختلف DNA را افزایش داده و آن‌ها را به ابزارهای مناسبی در مطالعات حفاظت ژنتیکی تبدیل کرده است (Haig, 1998; Avise, 2004). سیتوکروم b (Cyt-b)، یکی از مفیدترین ژن‌ها به منظور انجام کارهای فایلوژنتیک و جزء بهترین ژن‌های میتوکندریایی شناخته شده با توجه به ساختار و عملکرد محصول پروتئین آن می‌باشد (Esposti et al., 1993). این ژن از آن‌جایی که هم موقعیت‌های کدن در حال تغییر آرام و هم سریع را در بر می‌گیرد، برای پاسخ گویی به سوالات سیستماتیکی مختلف استفاده می‌شود (Meyer and Wilson, 1990; Normark et al., 1991; Irwin et al., 1991). از طرف دیگر با توجه به منشا مادری DNA میتوکندری، نوترکیبی در آن رخ نمی‌دهد، لذا این خاصیت باعث بروز اختلاف ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته شده است. از این‌رو برای تشخیص گروه‌هایی که برای ۱۰، ۱۰۰ یا ۱۰۰۰ سال از هم جدا بوده‌اند نشانگر خوبی می‌باشد (Berrebi,1996). میزان جهش نوکلئوتیدها در mtDNA مهره‌داران عالی ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از ژنوم هسته‌ای است که میزان آن ۲ درصد تغییر به ازای هر یک میلیون سال می‌باشد (Cronin et al., 1994). رفتگرماهیان‌خاردار ماهیانی با اندازه کوچک بوده و در اعماق آب‌های شیرین ساکن می‌باشند (Coad, 2013; Nalbant and Bianco, 1998; Bianco and Nalbant, 1980). زیستگاه ترجیحی آن‌ها قسمت‌های کناری رودخانه‌های با جریان آب آرام یا ایستا و کم عمق که دارای بسترهای سنگلاخی و یا گاها با رسوبات یا گیاهان حاشیه رودخانه پوشیده

شده‌اند، می‌باشد (Mousavi, 2011; Chen, 1981). این ماهیان به دلیل سایز کوچک خود، ارزش صید ورزشی و اقتصادی نداشته، اما ارزش زیبایی شناختی داشته و دارای طرفداران آکواریومی می‌باشند (Cod, 2012; Mousavi-Sabet, 2012).

۱ –۱- ۱– اهمیت و ضرورت انجام تحقیق

حفاظت از ماهیان آب شیرین در کشورهای خاور میانه کم‌تر مورد توجه قرار گرفته و در ایران استراتژی‌های حفاظت برای گونه‌های کوچک مانند *Cobitis* تعریف نشده است. بسیاری از اقدامات حفاظتی برای کشور ایران با کشورهای همسایه در مجاورت حوزه جنوبی دریای خزر صورت می‌گیرد. در مواردی آزمایشات هچری برای بهبود ذخایر بعضی از گونه‌های مهم تجاری اجرا شده، اما در مورد گونه‌های غیرتجاری و تفریحی تدابیر خاصی اعمال نشده است (Coad, 1980). از عمده‌ترین مشکلات برنامه‌های حفاظتی ماهیان آب شیرین در ایران فقدان اطلاعات علمی در مورد آن‌ها می‌باشد. مطالعات وضعیت تاکسونومیک ماهیان آب شیرین ایران به چند سال اخیر بر می‌گردد، در سال ۲۰۰۵ ماهیان بومی ایران توسط Coad بررسی شد. اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت، وضعیت حفاظتی گونه لوچ ماهی ایرانی *Paracobitis smithi* را بررسی کرد اما در مورد گونه‌های دیگر مطالعاتی انجام نشده است (IUCN red list, 2010). شکی نیست که بسیاری از اکوسیستم‌ها برای کاهش تاثیرات مضری که تغییرات زیستگاه باعث آن می‌شوند، نیاز به برنامه‌های حفاظتی دارند (Simila et al., 2006). بیشتر گونه‌های لوچ ماهیان بومی ایران هم‌اکنون از تغییر زیستگاه‌ها رنج می‌برند، بنابراین به منظور اعمال برنامه‌های حفاظتی برای این گونه‌ها، شناسایی الگوی پراکنش گونه‌ها، وضعیت تاکسونومی، ارزیابی اکوسیستم‌ها و رودخانه‌های محل زندگی آن‌ها مورد نیاز است.

۱-۱-۲- اهداف و فرضیه های تحقیق

هدف: هدف کلی از انجام این پژوهش بررسی تغییرات درون‌جمعیتی و بین‌جمعیتی رفتگرماهیان‌خاردار حوزه جنوبی دریای خزر و حوزه دجله، با بکارگیری صفات مورفولوژیکی و مولکولی (سیتوکروم b) به منظور تعیین وضعیت تاکسونومیکی آن‌ها می‌باشد که از ملزومات برنامه‌های حفاظتی جهت حفظ گونه‌های با ارزش بومی است.

فرضیات:

۱- جمعیت‌های متفاوتی از رفتگرماهیان‌خاردار در حوزه جنوبی دریای خزر و حوزه دجله وجود دارد.

۲- استفاده از DNA میتوکندریایی (سیتوکروم b) روش مناسبی برای تعیین وضعیت تاکسونومیک رفتگرماهیان‌خاردار و تفکیک آن-ها می‌باشد.

۱-۲- کلیات

۱-۲-۱- رده‌بندی رفتگرماهیان‌خاردار

رفتگرماهیان‌خاردار (لوچ ماهیان) در رده ماهیان استخوانی (TELEOSTEI)، فوق راسته (OSTARIOPHYSI)، راسته (Cypriniformes) و خانواده (Cobitidae) طبقه‌بندی می‌شوند. لوچ ماهیان ایران متعلق به دو خانواده Nemacheilidae و Cobitidae می‌باشند (Nalbant and Bianco, 1998). خانواده Cobitidae درآب‌های شیرین ایران دو جنس را شامل می‌شود که عبارتند از: *Sabanejewia* و *Cobitis* (Abdoli and Naderi, 2009) که جنس *Cobitis* با یک خار راست شدنی در زیر چشم و وجود فلس لامینا کانسترینی (Canestrini) در باله سینه‌ای جنس نر قابل تشخیص می‌باشد. سه گونه ثبت شده و موجود از جنس *Cobitis* در ایران عبارتند از: *Cobitis linea* Heckel, 1849 (Bianco and Nalbant, 1980)، *Cobitis faridpaki* و *Cobitis keyvani* (Mousavi-Sabet et al., 2011; 2012).

۱-۲-۲ - مشخصات رفتگرماهیان‌خاردار

شکل بدن این خانواده از لوچ‌ماهیان فوزیفورم (دوکی شکل) تا گرد یا کشیده است. این جنس با ویژگی‌های زیر قابل تشخیص می-باشند: خار زیرچشمی راست شدنی، دهان نیمه تحتانی و سه تا شش جفت سبیلک، بدن دارای یک ردیف رنگدانه در پشت و چهار ردیف در اطراف است، ۱۴ شعاع نرم در باله دمی و نرهای بالغ دارای فلس لامینا کانسترینی در قاعده شعاع باله‌های سینه‌ای می‌باشد (Kim, 2009; Kottelat and Freyhof, 2007).

۱-۲ -۳- پراکنش

رفتگرماهیان‌خاردار جنس *Cobitis Linnaeus*, 1758 متعلق به گروه ماهیان آب شیرین اولیه هستند و دارای دامنه پراکنش وسیعی می‌باشند. این ماهیان رودخانه‌های اورآسیا را از انگلیس و شبه جزیره ایبری تا شرق، مجمع الجزایر ژاپن، شبه جزیره کره، لائوس، ویتنام و هم‌چنین شمال آفریقا در مراکش را اشغال می‌کنند (Vasil'eva, 1998; Economidis and Nalbant, 1996; Suzawa, 2006; Erk'akan et al, 1998; 2008). گونه‌های رفتگرماهیان‌خاردار بومی در بعضی از کشورها مانند یونان، ترکیه، روسیه و بیشتر کشورهای شمالی و غربی اروپا به خوبی مطالعه شده‌اند، اما در بعضی مناطق مطالعات کمی در مورد این ماهیان صورت

گرفته که از جمله این مناطق، حوزه جنوبی دریای خزر می‌باشد (Mousavi et al., 2011). بنابراین دور از انتظار نیست که بیشتر محققان هنوز گونه *Cobitis taenia* Linnaeus, 1758 را برای ایران گزارش می‌دهند (Kiabi et al., 1999; Abdoli, 2000; Abdoli and Naderi, 2009; Coad, 2011). در حالی که این گونه تنها در شمال و شرق اروپا پراکنش دارد (Vasil'eva, 1998) و در دریای خزر پراکنش آن مربوط به حوزه شمالی این دریا می‌شود (Ráb Bohlen and Rab, 2001). این گونه (*C. taenia*) اشتباها، از آذربایجان نیز گزارش شده است (Froese and Pauly, 2011). گونه دیگر لوچ‌ماهیان‌خاردار در زیاگان (فون) ماهیان ایران *Cobitis linea* (Heckel, 1847) می‌باشد و متعلق به زیر جنس *Bicanestrinia bacescu*, 1962 بوده که با وجود دو فلس لامینا کانسترینی (laminas Canestrini) در قاعده شعاع‌های اول و دوم باله‌های سینه‌ای در جنس نر تشخیص داده می‌شود و در مناطق محدودی از ایران گزارش شده، این مناطق عبارت‌اند از: رودخانه کر نزدیک پرسپولیس و حوزه رودخانه کول در هرمزگان نزدیک داراب (Bianco and Nalbant, 1980; Nalbant and Bianco, 1998; Coad, 2011). در سال ۱۹۹۸، Nalbant و Bianco برای ایران سومین گونه را (*C. turcica* (Hankó, 1925 که از مرکز آناتولیا در ارگلی (Eregli) از کشور ترکیه گزارش شده بود ثبت کرداند. این گونه نیز هم‌چنین متعلق به زیر جنس *Bicanestrinia* بوده و در رودخانه‌های مختلف ترکیه یافت می‌شود (Erk'akan et al., 1999). *C. turcica* (Hankó, 1925) در سال ۱۹۹۸ توسط Nalbant و Bianco برای زیاگان (فون) ایران بر اساس دو نمونه جمع آوری شده از رودخانه کر نزدیک پرسپولیس گزارش شد و مطابق با مقاله آن‌ها Eschmeyer و Fricke در سال ۲۰۱۱ دامنه پراکنش این گونه ترکیه‌ای را به ایران بسط دادند. اما Coad در سال ۲۰۱۱ گونه ذکر شده را مطالعه کرد و آن را به عنوان *C. linea* گزارش داد. علاوه بر موارد ذکر شده زیاگان (فون) گونه‌های رفتگرماهیان حوزه دریای خزر شامل *C. melanoleuca* Nichols, 1925 نیز می‌باشد، تنها گونه از لوچ ماهیان می‌باشد که دارای گسترش متداوم از شرق و چین تا اروپا با جمعیت غربی در حوزه آبریز دانوب می‌باشد. این گونه حوزه‌های رودخانه‌های ولگا، رودخانه اورال، و هم‌چنین بعضی از خلیج‌های سواحل شمالی دریای خزر را اشغال می‌کند (Vasil'eva, 1988). در طول سال‌های گذشته *Cobitis faridpaki* و *Cobitis keyvani* از حوزه جنوبی دریای خزر گزارش شدند (Mousavi et al., 2011; 2012).

۱-۲-۴- اکولوژی

اعضای این خانواده (Cobitidae) ماهیان کوچک و کفزی می‌باشند (Perdices and Doadrio, 1997; Bianco and Nalbant, 1980; Bianco and Nalbant, 1998; Coad, 2011). این ماهیان در طول روز داخل شن و گل یا علف‌های

متراکم باقی می‌مانند و در شب به فعالیت می‌پردازند (Coad, 2008). کف رودخانه محل زندگی این ماهیان شنی بوده که گاها با گل و لجن پوشیده می‌شود و آب در حال جریان روشن و آرام است (Chen, 1981; Mousavi et al., 2011).

۱-۲-۵- طول عمر و بلوغ جنسی

تعداد جمعیت ماهیان جنس ماده بیشتر از جنس نر می‌باشد. در اولین بلوغ جنسی ماده‌ها دارای میانگین سنی $^{+}$۲ و طول کل بیشتر از ۴۵ میلی‌متر می‌باشند و نرها در $^{+}$۱ سال و با طول کل بیشتر از ۳۵ میلی‌متر به بلوغ جنسی می‌رسند. این جمعیت از لوچ ماهیان دامنه سنی محدود از $^{+}$۱ تا $^{+}$۵ دارند و اکثر آن‌ها دارای میانگین سنی $^{+}$۲ تا $^{+}$۳ سال می‌باشند (Mousavi-Sabet et al., 2011). تخم-ریزی این ماهیان از اوایل اردیبهشت تا اواسط تیر می‌باشد که به طور دسته‌جمعی تخم‌ریزی می‌کنند (Robotham, 1981; Marconato and Rasotto, 1989; Juchno and Boron, 2006a).

۱-۲-۶- تغذیه

غذای این ماهیان عمدتا از حشرات و سخت پوستان کوچک و کرم‌ها می‌باشد. این ماهیان طعمه‌ی خود را توسط سبیلک‌ها شناسایی می‌کنند (Cod, 2012). در مورد عادات تغذیه‌ای این ماهیان در حوزه جنوبی دریای خزر و حوزه دجله مطالعاتی صورت نگرفته است.

۱-۲-۷- ارزش اقتصادی

ارزش اقتصادی این گونه‌ها معطوف به طرفداران آکواریومی می‌باشد (Coad, 2012; Mousavi-Sabet, 2012).

۱-۳- نشانگرها (Markers)

صفاتی که تحت شرایط محیطی به صورت متفاوت بروز می‌کنند، بازتاب تفاوت‌های موجود در ردیف‌های DNA هستند. این تفاوت‌ها می‌توانند به عنوان نشانگر یا مارکر به کار گرفته شوند. هر ردیف متفاوت DNA و کروموزوم منشاء تفاوت صفات در افراد مختلف می-شود. برخی از ردیف‌های DNA هیچ تظاهری ندارند، نه صفت خاصی را کنترل می‌کنند و نه در ردیف اسید آمینه پروتئین‌ها تاثیری برجای می‌گذارند (مانند میکروستلایت‌ها). این دسته از تفاوت‌ها را می‌توان با روش‌های مختلف شناسایی، قابل رویت و ردیابی کرد، و به‌عنوان نشانگر مولکولی مورد استفاده قرار داد. این نشانگرها که تعدادشان تقریبا نامحدود است، فقط از راه تجزیه و تحلیل مستقیم DNA قابل ثبت هستند. برای آن‌که صفتی به عنوان مارکر ژنتیک مورد استفاده قرار گیرد باید دو ویژگی را داشته باشد: در بین دو

فرد متفاوت باشد (پلی مورفیسم) و به توارث برسد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). نشانگرها به چند دسته تقسیم می‌شوند که ما به دو دسته نشانگرهای مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی اشاره می‌کنیم:

۱-۳-۱- نشانگرهای مورفولوژیک

نشانگرهای مورفولوژیک از اولین نشانگرهای مورد استفاده بودند که با اندازه گرفتن شاخص‌های مورفومتریک و شمارش‌های مریستیک موجودات، تفاوت بین آن‌ها بررسی می‌شد. مشکلات و معایب متعددی در این روش گزارش شده است. عمده‌ترین آن‌ها عامل محیط است، این صفات به طور قابل ملاحظه‌ای تحت تاثیر شرایط محیطی تغییر می‌کنند. اغلب دارای توارث غالب و مغلوبی بوده و فراوانی و تنوع کمی دارند. گاهی برای مشاهده نتایج باید منتظر ظهور آن‌ها در نسل‌های بعد بود که در مورد برخی موجودات کار بی‌نتیجه‌ای بود (صفری، ۱۳۸۵).

۱-۳-۱-۱- صفات مورفومتریک و مریستیک

مورفومتریک و مریستیک دو نوع از ویژگی‌های مورفولوژیک هستند که به طور گسترده‌ای برای مطالعه ذخایر ماهیان استفاده می‌شوند. این ویژگی‌ها ابزارهای قوی برای مطالعه ذخایر گونه‌های مشابه هستند (Naeem et al., 2005). شکل بدن یک موجود زنده علاوه بر ژنتیک آن با اکولوژی و ویژگی‌های محیطی آن نیز تعیین می‌شود (Sara et al., 1999). برای مثال در ماهیان یک رابطه مستقیم بین رفتار شنا و عادات غذایی وجود دارد و تکامل شکل بدن ماهی به نوع و شیوه‌ای که ماهی غذا به دست می‌آورد بستگی دارد (Keast and ebb, 1966). مطالعات ریخت سنجی بر پایه یکسری از اندازه‌گیری‌هایی که اختلاف اندازه و شکل بدن را نشان می‌دهند پایه‌ریزی شده و داده‌های حاصل پیوسته بوده (Meyer, 1987) و با افزایش اندازه و سن ماهی به طور مداوم تغییر می‌کند در حالی‌که صفات شمارشی از لحاظ تعداد در طول رشد ماهی تقریبا ثابت باقی می‌مانند. ویژگی‌های شمارشی شامل قطعات بدن و سایر ویژگی‌ها بخصوص تعداد شعاع باله‌ها و فلس‌ها می‌باشند که می‌توانند بین و درون گونه‌ها متغیر باشند و از این‌رو در تشخیص و شناسایی ماهیان مفید هستند. ویژگی‌های شمارشی تحت تاثیر عوامل محیطی زیادی از جمله شوری، نور و اکسیژن محلول قرار داشته، اما درجه حرارت بیشتر از فاکتورهای دیگر مورد مطالعه قرار گرفته است. به عنوان مثال تعداد مهره‌های بدن نسبت به درجه حرارت محیط اغلب واکنش طبیعی منفی دارد. به طوری که در دماهای پایین تعداد مهره‌های ستون مهره بیشتر بوده و در آب و هوای معتدل کم‌تر است (Swain and Foote, 1999).

۱-۳-۲- نشانگرهای مولکولی DNA و mtDNA

اطلاعاتی که از طریق توالی DNA به فرزندان منتقل می‌شوند دارای یکسری امتیازاتی برای شناسایی سیستماتیک و تکاملی موجودات می‌باشند: ۱- ژنوم ماهی عمدتا شامل چندین بیلیون نوکلئوتید است که هرکدام اطلاعات مفیدی از آنالیز فیلوژنی دارند. ۲- این صفات برای مطالعه روابط بین دو گونه نزدیک و دور مفیداند. با پیشرفت علوم و کشف تکنیک‌های جدید در رابطه با بررسی کروموزوم‌ها و DNA این مارکرها تقریبا تمامی نقایص مارکرهای قبلی را برطرف کردند. ابداع و معرفی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بیشترین نقش را در توسعه و تکامل مارکرهای DNA داشته است. با PCR می‌توان یک قطعه خاص ژنوم را به چند میلیون نسخه رساند. مارکرهای DNA از نظر تکنیک و روش تولید، نحوه کاربرد، امتیاز بندی، تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج تفاوت‌های زیادی با یکدیگر دارند و هر کدام دارای نقاط ضعف و قدرت خاص هستند. این مارکرها از نظر بسیاری از ویژگی‌ها مانند میزان پلی-مورفیسم، غالبیت و هم‌بارز بودن، تعداد جایگاه‌های تجزیه شده در هر آزمایش، توزیع در سطح کروموزوم، نیاز یا عدم نیاز به توالی‌یابی DNA الگو و هزینه مورد نیاز با یکدیگر متفاوت‌اند. انتخاب نشانگر به هدف مطالعه و سطح پلوئیدی موجود مورد مطالعه بستگی دارد (نقوی، ۱۳۸۶).

دلایل موفقیت این مارکرها عبارتند از:

۱. عدم تاثیرپذیری آن‌ها از شرایط محیطی خارجی و داخلی موجود

۲. فراوانی فوق‌العاده این مارکرها

۳. فراهم نمودن امکان مطالعه در خارج از فصل رشد و تولیدمثل

۴. دقت و قابلیت مطلوب تفسیر نتایج

۵. هم‌بارز بودن بسیاری از این مارکرها

۶. امکان استفاده از آن‌ها برای گونه‌های در خطر انقراض

۷. سهولت تشخیص افراد خالص و ناخالص

۸. سهولت امتیاز دهی و تجزیه و تحلیل داده‌ها

۹. دسترسی به برنامه‌های رایانه‌ای قوی برای تفسیر سریع نتایج

۱۰. امکان به کارگیری آن‌ها در مراحل نخستین رشد جنینی موجودات

۱۱. دقت وصحت بالای نتایج