



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره ششم، شماره سوم، پاییز ۹۷

<http://jair.gonbad.ac.ir>

## تنوع ریختی گونه‌های لارو شورت‌ماهیان (Perciformes: Sillaginidae) بر اساس آنالیز ریخت‌سنجی هندسی در شمال خلیج فارس، محدوده استان بوشهر

رسول قربانی<sup>۱\*</sup>، محمد امینی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>دانشیار، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

<sup>۲</sup>آستادیار، دانشکده محیط زیست و منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء بهبهان، بهبهان، ایران

تاریخ ارسال: ۹۵/۲/۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۵

### چکیده

این پژوهش با هدف ارزیابی کارآیی روش ریخت‌سنجی هندسی برای تعیین شکل لارو ماهی و شناسایی آنها در سطح گونه انجام شد. گونه‌های خانواده شورت‌ماهیان (Perciformes: Sillaginidae) به دلیل سخت بودن شناسایی مراحل لاروی به عنوان مدل انتخاب شدند. تعداد ۴۷ عدد لارو ماهی از اردیبهشت ۱۳۹۲ تا فروردین ۱۳۹۳ از خورهای مرکزی استان بوشهر توسط تور بونگو جمع‌آوری شد. در ابتدا نمونه‌ها بر اساس مرحله رشد و نمو به سه گروه پیش‌خمیدگی، خمیدگی و پس‌خمیدگی تقسیم شده و سپس لاروهای مرحله خمیدگی و پس‌خمیدگی بر اساس تعداد میومر به سه دسته ۳۴، احتمالاً ۳۴ و ۳۸ میومری تفکیک شد. لاروهای دارای ۳۴ میومر گونه *Sillago sihama* شناسایی شدند. پس از شمارش میومرها، از نیمرخ چپ ماهیان عکس‌برداری به عمل آمده و تعداد ۸ لندمارک روی تصاویر دو بعدی انتخاب و رقمی سازی شد. صفات شمارشی و داده‌های شکلی حاصله، پس از آنالیز پروکراست (روی هم‌گذاری)، با استفاده از روش‌های آماری چند متغیره PCA و DFA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. از نظر شکلی، بویژه بین گروه ۳۴ میومری با دو گروه دیگر تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده شد. در گروه ۳۴ میومری فاصله نوک پوزه تا انتهای لوله گوارش کوتاه‌تر بود. گروه ۳۸ میومری، ارتفاع بدن بیشتری نسبت به گروه احتمالاً ۳۴ میومری داشت. به‌طور کلی، روش ریخت‌سنجی هندسی می‌تواند به‌طور مؤثری برای شناسایی لارو ماهی در سطح گونه استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: شورت‌ماهیان، گونه‌ها، شناسایی، ریخت‌سنجی هندسی، بوشهر

\*نویسنده مسئول: [rasulghorbani@gmail.com](mailto:rasulghorbani@gmail.com)

## مقدمه

تشخیص گونه‌ها یکی از پیش‌نیازهای اساسی حفاظت از تنوع زیستی و مدیریت شیلاتی است (Ibañez *et al.*, 2007). بدون شناسایی دقیق گونه نمی‌توان قضاوت صحیحی در زمینه زیست‌شناسی یا بوم‌شناسی آن داشت. روش‌های ریخت‌سنجی سنتی زمان‌بر و غیردقیق بوده و خطاهای فراوانی دارند. روش‌های ژنتیکی نیز پرهزینه بوده و در طبیعت یا آزمایشگاه‌های کوچک و غیرمجهز قابل انجام نیستند (Hutchinson *et al.*, 2001). در روش آنالیز ریخت‌سنجی ژئومتری یا هندسی، داده‌ها از مختصات نقاط ویژه‌ای به دست می‌آید که این نقاط در گونه مورد نظر دارای اهمیت هستند. امروزه آنالیز لندمارک‌ها با استفاده از روش‌های آماری چندمتغیره و تکنولوژی‌های عکاسی دیجیتال پیشرفته برای افزایش دقت اندازه‌گیری‌ها و کنترل بزرگ‌نمایی، به روش دقیقی برای تفکیک گونه‌ها و ذخیره‌های مختلف ماهی تبدیل شده است (Cadrin *et al.*, 2014). باتوجه به مشکل بودن شناسایی لارو ماهی‌ها، این روش می‌تواند به صورت ویژه در این گروه مناسب باشد. استفاده از این روش در لارو ماهیان بسیار محدودتر بوده که تنها یک مورد از آنها در ایران انجام شده است. بانی و همکاران (Bani *et al.*, 2015) با بررسی تغییرات ریختی و صفات شمارشی در ماهی سیم *Abramis brama orientalis* تأکید می‌نمایند که در مرحله Post flexion (پس‌خمیدگی) تغییرات کاملاً مشخصی در رشد و ویژگی‌های ریختی لارو ایجاد می‌گردد. آرا و همکاران (Ara *et al.*, 2013) با بررسی لارو شش خانواده یلی ماهیان (Terapontidae)، گاوماهیان (Gobiidae)، شوورت‌ماهیان، گوازیماهیان (Nemipteridae)، بلنی‌ماهیان (Blenniidae) و پنجزاری‌ماهیان (Leiognathidae) دریافتند که لارو این خانواده‌ها از نظر ریخت‌شناسی تفاوت کاملاً مشخصی نشان می‌دهند. تنها پژوهشی که تاکنون در مورد شناسایی لاروها در سطح گونه با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی انجام شده در مورد خانواده شهری ماهیان (Lethrinidae) بوده است. در این پژوهش پنتون و همکاران (Ponton *et al.*, 2013) دو گونه از شهری ماهیان که با روش‌های قدیمی قابل شناسایی نبودند را تفکیک و شناسایی نمودند.

شورت‌ماهیان از ماهیان شاخص مناطق ساحلی بوده و در حاشیه خط ساحلی زیست می‌کنند به طوری که تعداد گونه‌های بسیار کمی از آنها در آب‌های تا حدود ۱۸۰ متر یافت می‌شوند (McKay, 1992). گونه‌های این خانواده در اقیانوس هند و غرب اقیانوس آرام دیده می‌شوند (Nelson, 2006). افراد این خانواده از نظر ظاهری بسیار شبیه به هم بوده و شناسایی آنها حتی نمونه‌های بالغ برای ماهی شناسان مشکل می‌باشد. این خانواده در آب‌های ساحلی جنوب ایران نیز بسیار فراوان است، به طوری که در اغلب بررسی‌های ایکتیوپلانکتونی جزء فراوان‌ترین خانواده‌ها بوده است (Rabbaniha *et al.*, 2002; Koochaknejad *et al.*, 2011). در خلیج فارس احتمال حضور لارو چهار گونه از این خانواده وجود دارد، گونه *Sillago sihama* پراکنش وسیع دارد ولی دو گونه *S.attenuata* و *S.arabica* بومی

خلیج فارس بوده و پراکنش محدودتری دارند (Richards, 2008). در این منبع گونه چهارم به‌طور مشخص شناسایی نشده است. در پایگاه اینترنتی [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) (2018) گونه دیگری که در خلیج فارس زیست می‌کند *Sillaginopodys chondropus* ذکر شده است. در جدول ۱ مشخصات مرستیکی آنها ارائه شده است.

جدول ۱- مشخصات مرستیکی شورت‌ماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان

گونه	شعاع‌های باله			مهره	خارهای آبششی
	پشتی	مخرجی	سینه‌ای		
<i>Sillago sihama</i>	XI+I, ۲۰-۲۳	II, ۲۱-۲۳	۱۶-۱۷	۱۴+۲۰=۳۴	۸-۱۰+
<i>Sillago spp.</i>	X-I, ۲۲-۲۴	II, ۲۰-۲۴			
<i>Sillago arabica</i>	XII-۲۲-۲۴	II, ۲۲-۲۴		۲۳=۳۸-۴۰	
	XIII+I,			۱۵-۱۶+۲۲	
<i>Sillago attenuata</i>	XII-۱۹-۲۱	II, ۱۸-۲۰		۱۵+۲۲=۳۷-۳۹	
	XIII+I,				

همان‌طور که دیده می‌شود گونه *S. sihama* از نظر تعداد کل میومر و میومرهای شکمی و دمی با گونه‌های دیگر تفاوت دارد و انتظار می‌رود نسبت اندازه قسمت‌های مختلف بدن نیز متفاوت باشد. برای کشف این تفاوت احتمالی بهترین روش، آنالیز ریخت‌سنجی هندسی می‌باشد. از طرفی در مراحل ابتدایی تر لاروی یعنی مرحله پیش‌خمیدگی و خمیدگی، به دلیل شکل نگرفتن باله‌ها، تنها مشخصه مرستیکی قابل استفاده برای شناسایی تعداد میومر است. نمونه‌هایی که در الکل نگهداری می‌شوند (به منظور پژوهش‌های ژنتیکی) بدن لارو شفافیت خود را از دست داده و شمارش میومرها ناممکن یا بسیار سخت می‌شود. همچنین باتوجه به فراوانی لارو این خانواده در آب‌های ساحلی ایران، شمارش میومرها در همه نمونه‌ها در یک نمونه‌برداری بسیار زمان‌بر است. بنابراین کشف یک ویژگی مورفومتریک مشخص برای تفکیک قطعی این گونه‌ها می‌تواند بسیار مفید و راهگشا باشد.

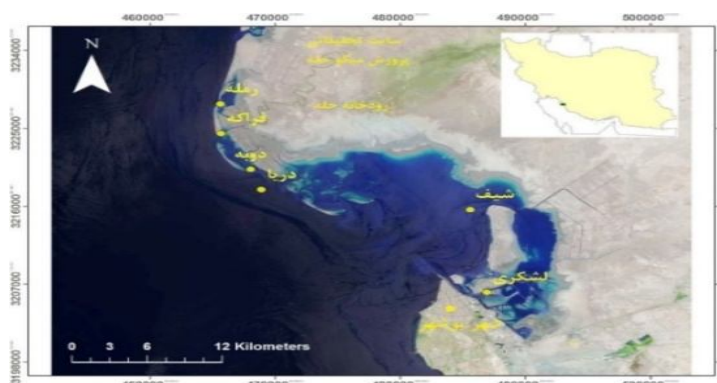
### مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری در خورهای فراکه، شیف، لشکری، دویه، رمله و یک ایستگاه دریایی انجام شد (شکل ۱). نمونه‌برداری از نوزادان با تور دو قلو بونگو<sup>۱</sup> با چشمه ۳۰۰ میکرون به صورت دو ماه یک بار انجام شد. در هر ایستگاه ابتدا عمق منطقه با عمقیاب اندازه‌گیری شد و سپس براساس آن و محاسبه طول سیم، تور به کف ارسال و کشش به صورت مورب انجام شد. توراندازی با استفاده از قایق فایبرگلاس و با کمک وینچ دستی

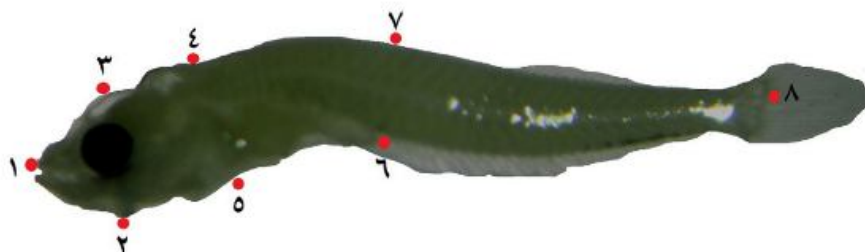
1. Bongo

با حرکت ملایم شناور و با حفظ زاویه کشش (۴۵ درجه) انجام شد (Rabbaniha *et al.*, 2002). پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، محتویات یکی از تورها در فرمالین ۵٪ و دیگری برای آزمایش‌های ژنتیکی در الکل اتیلیک ۹۵٪ نگهداری شد (Di'az-Viloria *et al.*, 2005; Webb *et al.*, 2006; Hubert *et al.*, 2010). نمونه‌ها بعد از انتقال به آزمایشگاه و پس از گذراندن از صافی با احتیاط با آب مقطر شسته و جداسازی شدند. سپس نمونه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی، شناسایی و شمارش شدند. به‌منظور نگهداری دائمی آنها، محلول الکل اتانول ۷۰٪ (Paulic and Papst, 2012) استفاده شد. در این مرحله شناسایی تا سطح خانواده صورت گرفت.

ابتدا تعداد میومر هر لارو شمارش شده و به‌عنوان یکی از مشخصات شناسایی آن ثبت شد. تعداد ۴۷ عدد لارو انتخاب شده و به‌منظور شناسایی گونه‌ها به روش آنالیز ریختی شبکه‌ای، هر نمونه کدگذاری شد. برای استخراج داده‌های شکل بدن در روش ریخت‌سنجی هندسی، از نیمرخ چپ نمونه‌ها تصاویر دیجیتال دو بعدی تهیه گردید. سپس تعداد ۸ لندمارک همساخت بر تصاویر دوبعدی تعریف و با کمک نرم‌افزار tpsUtil از تصاویر دیجیتالی، فایل tps تهیه و لندمارک‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار tpsDig2 رقمی شدند (Rohlf, 2010) (شکل ۲).



شکل ۱- نقشه منطقه نمونه‌برداری و موقعیت ایستگاه‌ها لارو شورت ماهیان (Sillaginidae) در خلیج فارس و دریای عمان



شکل ۲- لندمارک‌های تعریف شده روی سمت چپ لارو شورت‌ماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان. ۱- نوک پوزه (فک بالا)، ۲- انتهای فک پایین، ۳- روی سر، ۴- فرورفتگی پس سر، ۵- ابتدای لوله گوارش (انتهای سر)، ۶- انتهای لوله گوارش، ۷- نقطه مقابل انتهای لوله گوارش (ضخامت بدن)، ۸- انتهای ستون مهره‌ها

داده‌های ریخت‌سنجی تحت تأثیر اندازه ماهی قرار دارد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها باید این اثر حذف شود (Schreck and Moyle, 1990). داده‌های لندمارک پس از روی هم‌گذاری براساس General Procrustes Analysis برای حذف اثرات اندازه، موقعیت و جهت آنالیز شدند. به دلیل وجود سه مرحله متفاوت در رشد لاروها شامل پیش‌خمیدگی<sup>۱</sup>، خمیدگی و پس‌خمیدگی ابتدا همه لاروها با استفاده از روش‌های تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) و تغییرات شکلی متعارف (CVA) با ارزش  $p$  حاصل از ده‌هزار بار نمونه‌گیری (Permutation Test) مورد تحلیل قرار گرفتند. سپس نمونه‌های بزرگتر در مرحله خمیدگی و پس‌خمیدگی بر اساس تعداد میومر شمارش شده، به دو گروه دارای ۳۴ و ۳۸ میومری تقسیم شدند. برای تأیید وجود گروه‌های مختلف بین نمونه‌ها (یعنی آزمودن فرضیه وجود دو یا چند گونه بین نمونه‌ها) از آزمون تجزیه واریانس چندمتغیره (MANOVA) استفاده شد (Kelso *et al.*, 2012). در هر مرحله رشد نیز با استفاده از روش‌های تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) با ارزش  $p$  حاصل از ده‌هزار بار نمونه‌گیری لاروها مورد تحلیل قرار گرفتند. برای تعیین لندمارک‌هایی که بیشترین تغییرات را دارند آزمون Discriminant function به کار رفت. تمامی تجزیه و تحلیل آماری همراه با رسم نمودارها در-SPSS 16، PAST-2.15 (Hammer *et al.*, 2001) و MorphoJ-1.02 (Klingenberg, 2011) انجام شد.

## نتایج

لاروهای مرحله خمیدگی و پس‌خمیدگی بر اساس تعداد میومر در قالب گروه‌های ۳۴ یا ۳۸ میومری شناسایی شدند. شمارش دقیق میومرها در تعدادی از لاروهای مرحله پس‌خمیدگی به دلیل کدر شدن بدن در اثر نگهداری در الکل امکان‌پذیر نبود. این گروه با عنوان ۳۴q نامگذاری شدند.

### 1. Preflexion

همچنین شمارش میومرها در لاروهای مرحله پیش‌خمیدگی مقدور نبود و این گروه نیز به صورت کلی بررسی شدند. آزمون همبستگی فواصل پروکراست و تانژانت با استفاده از نرم‌افزار tps Small-1.20 تناسب داده‌های روی هم‌گذاری شده برای انجام تجزیه و تحلیل‌های آماری را تأیید کرد. ابتدا برای سنجش فرض شباهت شکلی سه مرحله رشد پیش‌خمیدگی، خمیدگی و پس‌خمیدگی، این سه مرحله توسط آزمون تغییرات شکلی متعارف (CVA) مقایسه شدند. آزمون Wilk's Lambda تناسب داده‌ها برای آزمون CVA را نشان داد ( $P < 0/01$ ). نتایج آزمون CVA نشان داد که براساس مربع فواصل Mahalanobis (جدول ۲) بین همه مراحل رشد لارو تفاوت معنی‌دار وجود دارد ( $P < 0/01$ ). بنابراین آزمون‌های مختلف روی هر مرحله از رشد (به غیر از پیش‌خمیدگی به دلیل عدم امکان شمارش میومرها) به صورت مجزا انجام شد.

جدول ۲- فواصل مربع ماهالانوبیس و مقدار  $p$  داده‌های شکلی مراحل مختلف رشد لارو شورت ماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان

مرحله رشد	پیش‌خمیدگی	خمیدگی	پس‌خمیدگی
پیش‌خمیدگی	-	-	-
خمیدگی	۲/۶	-	-
	۰/۰۰۰۱*		
پس‌خمیدگی	۶/۱۶	۴/۳۷۸	-
	۰/۰۰۰۱*	۰/۰۰۰۱*	

پس‌خمیدگی - بررسی الگوهای تفاوت بالقوه بین جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) انجام شد. مطابق با این آنالیز در مجموع ۱۲ مؤلفه اصلی مشخص شد که بر اساس مقدار جدا کننده Joliffe سه مؤلفه اول با درصد تجمعی ۹۲/۰۲۷ درصد بیشترین بار عاملی را به خود اختصاص دادند (جدول ۳).

جدول ۳- کل پراکندگی توضیح داده شده با استفاده از تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) لاروهای پس-خمیدگی شورت‌ماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان

مؤلفه	مقدار ویژه	درصد پراکندگی	درصد تجمعی
۱	۰/۰۰۴۷۸۱۱۳*	۶۲/۸۲۷	۶۲/۸۲۷
۲	۰/۰۰۱۷۷۶۸۳*	۲۳/۳۴۸	۸۶/۱۷۵
۳	۰/۰۰۰۴۴۵۳۳*	۵/۸۵۲	۹۲/۰۲۷

همچنین براساس بارهای عاملی سه مؤلفه اول، بیشترین تغییرات در لندمارک‌های ۶ و ۷ مشاهده شد که نشان‌دهنده موقعیت مخرج (انتهای لوله گوارش) می‌باشد (جدول ۴). بر اساس آزمون DFA نیز لندمارک‌های ۶ و ۷ بهترین لندمارک برای تفکیک بین گروه‌ها بودند (جدول ۵). برای سنجش فرض شباهت شکلی سه گروه ۳۴، ۳۴q و ۳۸ میومری آزمون تغییرات شکلی متعارف (CVA) انجام شد. آزمون ویلکزلامبدا تناسب داده‌ها برای آزمون CVA را نشان داد ( $P < 0.01$ ). نتایج آزمون CVA نشان داد که بر اساس فواصل مربع ماهالانوبیس (جدول ۶) بین سه گروه میومری تفاوت معنی‌دار وجود دارد ( $P < 0.01$ ) (شکل ۳). اگرچه هر سه گروه دارای تفاوت معنی‌دار هستند ولی گروه ۳۴ میومری با دو گروه دیگر فاصله ماهالانوبیس بیشتری دارد.

جدول ۴- بارهای عاملی سه مؤلفه اصلی در آزمون PCA برای لاروهای پس‌خمیدگی شورت‌ماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان

نقاط	۱	۲	۳
X1	۰/۰۴۶	۰/۰۴۳	۰/۲۸۷
Y1	۰/۰۴۱	۰/۴۰۲	۰/۰۳۶
X2	۰/۲۰۵	۰/۱۶۳	۰/۳۳۵
Y2	۰/۰۳۷	۰/۱۹۵	۰/۲۴۴
X3	۰/۱۳۱	۰/۱۴۶	۰/۱۰۸
Y3	۰/۱۰۴	۰/۰۹۶	۰/۱۸۲
X4	۰/۱۹۸	۰/۱۱۵	۰/۳۰۷
Y4	۰/۱۰۷	۰/۱۹۹	۰/۲۳۰
X5	۰/۱۸۱	۰/۲۱۱	۰/۵۹۶
Y5	۰/۱۳۲	۰/۲۰۹	۰/۱۴۱
X6	۰/۵۸۹	۰/۱۱۸	۰/۰۶۹
Y6	۰/۱۸۸	۰/۴۰۱	۰/۲۲۸
X7	۰/۵۴۴	۰/۰۲۱	۰/۰۷۴
Y7	۰/۰۶۵	۰/۳۹۸	۰/۱۰۴
X8	۰/۳۷۱	۰/۰۲۶	۰/۳۱۶
Y8	۰/۰۳۹	۰/۵۱۵	۰/۰۶۰

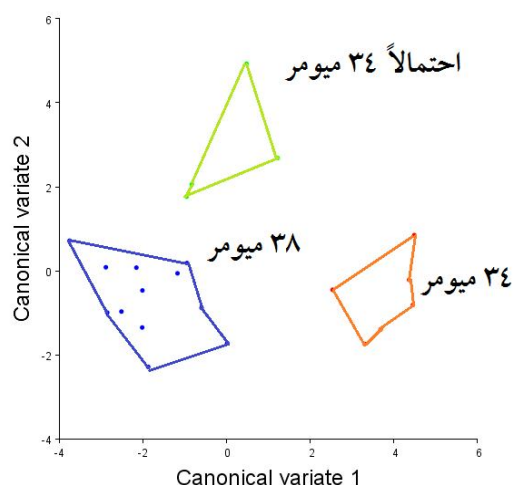
جدول ۵- بارهای عاملی دو مؤلفه اصلی در آزمون DFA برای لاروهای پس‌خمیدگی شورتماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان.

نقاط	۱	۲
X1	-۵۵/۵۴	-۵۱/۹۶
Y1	-۰/۲۲	-۱۶/۵۴
X2	۳۵/۳۲	۳۰/۹۱
Y2	۱۶/۱۱	۵۸/۰۱
X3	۱۶/۱۳	۱۶/۵۸
Y3	-۳۸/۰۷	-۳۱/۲۲
X4	۵۶/۹	۳۱/۴۳
Y4	-۷/۸۳	-۰/۱۷
X5	-۵۷/۸	-۳۰/۷۲
Y5	۷/۲۷	-۱۹/۷۳
X6	-۱۹/۶۲	-۴۶/۹۸
Y6	-۹۹/۹۳	۳۱/۷۷
X7	۴۹/۴۵	۴۴/۴۶
Y7	۱۲۳/۵۴	-۳۱/۶۶
X8	-۲۴/۸۳	۶/۲۸
Y8	-۰/۸۷	۹/۵۴

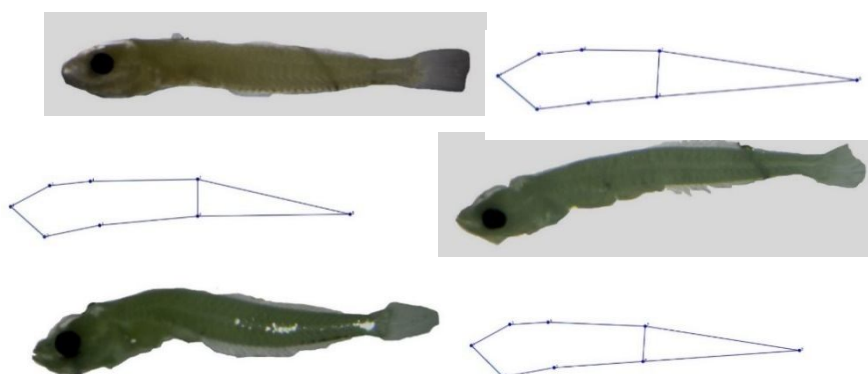
جدول ۶- فواصل مربع ماهالانویس و مقدار p داده‌های شکلی سه گروه ۳۴، ۳۴q و ۳۸ میومری مرحله لارو پس‌خمیدگی شورتماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان

مرحله رشد	۳۴	۳۴q	۳۸
۳۴	-		
۳۴q	۵/۱۷۵۱ ۰/۰۰۳*		
۳۸	۵/۷۰۲۳ ۰/۰۰۲*	۳/۹۶۹۶ ۰/۰۰۳*	

نمایش شکل کلی (Consensus) سه گروه ۳۴، ۳۴q و ۳۸ میومری با استفاده از شکل میانگین لاروهای هر گروه به‌دست آمد (شکل ۴). این شکل‌ها نیز نتایج فواصل ماهالانویس را تأیید می‌نماید، به‌طوری‌که دو لندمارک ۶ و ۷ در گروه‌های مختلف نسبت به قسمت ابتدایی بدن در موقعیت متفاوتی قرار گرفته‌اند.



شکل ۳- نمودار پراکنش در سه گروه ۳۴، احتمالاً ۳۴ و ۳۸ میومری بر اساس تجزیه و تحلیل تغییرات شکلی متعارف لارو شورت‌ماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان



شکل ۴- نمایش شکل کلی و تصویر لارو گروه ۳۴ (بالا)، احتمالاً ۳۴ (وسط) و ۳۸ (پایین) میومری مرحله پس-خمیدگی شورت‌ماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان

بررسی الگوهای تفاوت بالقوه بین جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) انجام شد. مطابق با این آنالیز در مجموع ۱۱ مؤلفه اصلی مشخص شد که بر اساس مقدار جداکننده جولیف، دو مؤلفه اول با دارا بودن بیش از ۸۳ درصد تغییرات، بیشترین بار عاملی را به خود اختصاص داد (جدول ۷). همچنین براساس بارهای عاملی دو مؤلفه اول، بیشترین تغییرات در لندمارک‌های

۱، ۶، ۷ و ۸ مشاهده شد که به ترتیب نشان‌دهنده موقعیت نوک پوزه، انتهای لوله گوارش و انتهای نوتوکورد می‌باشد (جدول ۸). بر اساس آزمون DFA بهترین لندمارک‌ها برای تمایز بین گروه‌های ۳۴ و ۳۸ میومری در مرحله خمیدگی شامل لندمارک‌های ۲، ۳، ۵ و ۶ بود که به ترتیب نشان‌دهنده موقعیت فک پایین، روی سر و ابتدای لوله گوارش می‌باشد (جدول ۹). برای سنجش فرض شباهت شکلی دو گروه ۳۴ و ۳۸ میومری آزمون تغییرات شکلی متعارف (CVA) انجام شد. آزمون ویلکز لامبدا تناسب داده‌ها برای آزمون CVA را نشان داد ( $P < 0/01$ ). نتایج آزمون CVA نشان داد که بر اساس فواصل ماهالانوبیس (جدول ۱۰) بین دو گروه تفاوت معنی‌دار وجود دارد ( $P < 0/01$ ).

جدول ۷- کل پراکندگی توضیح داده شده با استفاده از تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) لاروهای خمیدگی شورت‌ماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان

مؤلفه	مقدار ویژه	درصد پراکندگی	درصد تجمعی
۱	*۰/۰۰۲۶۵۴۰	۵۰/۸۰۳	۵۰/۸۰۳
۲	*۰/۰۰۱۷۰۶۶	۳۲/۶۶۸	۸۳/۴۷۱

جدول ۸- بارهای عاملی دو مؤلفه اصلی در آزمون PCA برای لاروهای خمیدگی شورت‌ماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان

نقاط	۱	۲
X1	۰/۰۲۲	-۰/۲۰۷
Y1	۰/۴۴۲	۰/۰۶۱
X2	۰/۲۹۱	-۰/۰۲۷
Y2	۰/۱۱۰	-۰/۱۲۸
X3	۰/۰۹۱	-۰/۰۲۸
Y3	۰/۰۹۶	-۰/۱۱۶
X4	۰/۲۱۱	-۰/۳۵۴
Y4	۰/۱۷۱	-۰/۱۱۴
X5	۰/۰۵۹	۰/۵۶۲
Y5	۰/۲۵۱	-۰/۱۵۲
X6	۰/۰۶۳	-۰/۴۵۹
Y6	۰/۳۹۲	-۰/۱۲۱
X7	۰/۰۶۳	-۰/۴۱۴
Y7	۰/۳۴۷	-۰/۱۳۵
X8	۰/۰۵۷	۰/۱۶۵
Y8	۰/۵۱۳	-۰/۰۲۷

تنوع ریختی گونه‌های لارو شورت‌ماهیان (Perciformes: Sillaginidae)...

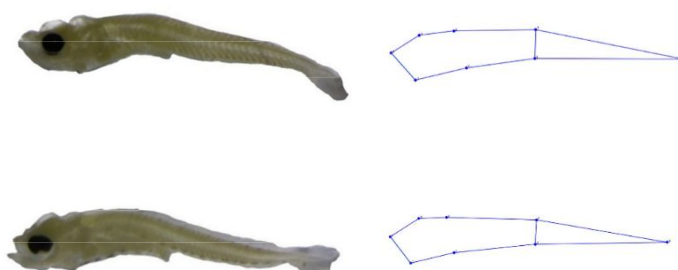
جدول ۹- بارهای عاملی مؤلفه اصلی در آزمون DFA برای لاروهای خمیدگی شورت‌ماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان

نقاط	۱
X1	۸۲/۵۶
Y1	۵۸/۲۲
X2	۸۴/۳۱
Y2	۱۲۱/۸۱
X3	-۱۲۲/۰۸
Y3	-۱۲۶/۴۷
X4	۷۷/۸
Y4	۱۳/۳۸
X5	-۵۵/۱۳
Y5	-۱۲۷/۹۶
X6	-۱۰۴/۰۵
Y6	۳۷/۷۵
X7	-۵۹/۱۳
Y7	۴۵/۰۴
X8	۹۵/۷۳
Y8	-۲۱/۷۶

جدول ۱۰- فواصل ماه‌لانوویس و مقدار p داده‌های شکلی سه گروه ۳۴، ۳۸ و ۳۸ میومری مرحله پس‌خمیدگی شورت‌ماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان

مرحله رشد	۳۴	۳۸
۳۴	-	
۳۸	۸/۵۹۱۵ ۰/۰۰۰*	-

نمایش شکل کلی دو گروه ۳۴ و ۳۸ میومری با استفاده از میانگین لاروهای هر گروه به‌دست آمد در شکل ۵ ارائه شده است.

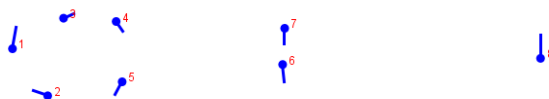


شکل ۵- نمایش شکلی و تصویر لارو گروه ۳۴ (بالا) و ۳۸ (پایین) میومری مرحله خمیدگی شورت‌ماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان

پیش‌خمیدگی: بررسی الگوهای تفاوت بالقوه بین جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) انجام شد. مطابق با این آنالیز در مجموع ۱۲ مؤلفه اصلی مشخص شد که بر اساس مقدار جدا کننده جولیف، دو مؤلفه اول با دارا بودن بیش از ۸۷ درصد تغییرات، بیشترین بار عاملی را به خود اختصاص داد (جدول ۱۱). همچنین براساس بارهای عاملی مؤلفه اول، بیشترین تغییرات در لندمارک‌های ۱، ۲، ۶، ۷ و ۸ دیده شد، که به ترتیب نشان‌دهنده موقعیت نوک پوزه، فک پایین، انتهای لوله گوارش و انتهای نوتوکورد می‌باشند (جدول ۱۲، شکل ۶).

جدول ۱۱- کل پراکندگی توضیح داده شده با استفاده از تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) لاروهای پیش‌خمیدگی شورت‌ماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان

مؤلفه	مقدار ویژه	درصد پراکندگی	درصد تجمعی
۱	۰/۰۰۵۶۰۳۹۵*	۸۰/۷۹۷	۸۰/۷۹۷
۲	۰/۰۰۰۴۴۳۲۵*	۶/۳۹۱	۸۷/۱۸۷



شکل ۶- نمایش تغییرات لندمارک‌ها طبق آزمون PCA در مرحله پیش‌خمیدگی شورت‌ماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان

جدول ۱۲- بارهای عاملی دو مؤلفه اصلی در آزمون PCA برای لاروهای پیش‌خمیدگی شورت‌ماهیان (Sillaginidae) خلیج فارس و دریای عمان

نقاط	۱	۲
X1	۰/۰۸۶	۰/۲۰۵
Y1	۰/۴۴۷	۰/۱۸۵
X2	۰/۳۰۳	۰/۱۸۸
Y2	۰/۱۲۱	۰/۲۰۲
X3	۰/۲۱۷	۰/۰۳۷
Y3	۰/۱۰۱	۰/۲۴۱
X4	۰/۱۴۲	۰/۱۳۰
Y4	۰/۲۰۲	۰/۴۳۴
X5	۰/۱۵۴	۰/۲۲۷
Y5	۰/۲۶۷	۰/۳۰۸
X6	۰/۰۳۱	۰/۱۱۶
Y6	۰/۳۶۱	۰/۵۲۷
X7	۰/۰۱۴	۰/۰۱۹
Y7	۰/۳۲۵	۰/۲۹۳
X8	۰/۰۰۵	۰/۰۹۳
Y8	۰/۴۸۴	۰/۲۲۳

### بحث و نتیجه‌گیری

به‌طور کلی شورت‌ماهیان بالغ از نظر تنوع شکل و ریخت بدن تفاوت بسیار کمی دارند (McKay, 1992) به‌طوری‌که شناسایی آنها برای ماهی‌شناسان همیشه سخت و گیج‌کننده بوده است. لارو این خانواده نیز شرایط مشابهی داشته و شناسایی آنها با استفاده از ویژگی‌های معمول (الگوی رنگدانه‌ای، تفاوت‌های ظاهری اندام‌های مختلف، مورفومتریک و مریستیک رایج) تقریباً غیرممکن به‌نظر می‌رسد (Richards, 2008).

لارو ماهیان در طول رشد و نمو سه مرحله مشخص پیش‌خمیدگی، خمیدگی و پس‌خمیدگی را طی می‌نمایند که در بسیاری از خانواده‌های ماهی تغییرات شکل بین آنها بسیار زیاد و واضح است (Leis and Carson-Ewart, 2000). طبق نتایج به‌دست آمده در این پژوهش لارو شورت‌ماهیان نیز در سه مرحله رشد و نمو تفاوت شکلی زیادی دارند. بنابراین نمی‌توان این روش را برای تمایز بین گونه‌ها در همه مراحل رشد ماهی به‌صورت یکنواخت بکار برد، زیرا ممکن است تفاوت نشان داده شده در

شکل لارو مربوط به رشد و نمو باشد نه مربوط به تفاوت واقعی گونه‌های مختلف. به‌همین دلیل همه آنالیزهای مربوط به تفکیک و شناسایی گونه‌ها در هر مرحله رشد و نمو به‌صورت مجزا انجام شد. نتایج نشان داد که در هر مرحله رشد، لندمارک‌های متفاوتی می‌توانند در تفکیک گروه‌های ۳۴ و ۳۸ میومری استفاده شوند. در مراحل خمیدگی و پس‌خمیدگی امکان جداسازی اولیه لاروها بر اساس تعداد میومر وجود داشت، از این رو تطبیق داده‌های حاصل از روش ریخت‌سنجی هندسی با شناسایی انجام شده امکان‌پذیر بود. تطبیق این اطلاعات نشان داده که به‌ویژه در مرحله پس‌خمیدگی موقعیت انتهایی لوله گوارش برای شناسایی لاروها قابل استفاده است. در لاروهای پس‌خمیدگی نتایج آزمون‌های PCA و DFA منطبق بر هم بود. یعنی دو لندمارک ۶ و ۷ که بیشترین تغییرات را در کل لاروهای این مرحله نشان دادند، از طرفی برای تفکیک بین گروه‌ها هم بهترین لندمارک بودند. نکته قابل توجه این است که بین گروه ۳۴ میومری و دو گروه ۳۸ میومری و گروه احتمالاً دارای ۳۴ میومر، تفاوت بیشتر در جهت افقی دیده می‌شود یعنی در جهت محور X، ولی تفاوت بین دو گروه ۳۸ و احتمالاً ۳۴ میومری تفاوت بیشتر در جهت محور عمودی می‌باشد. بنابراین تفاوت بین گروه ۳۴ میومری با بقیه در موقعیت انتهایی لوله گوارش (مخرج) نسبت به ابتدا و انتهای بدن می‌باشد و در واقع مخرج به قسمت جلویی بدن نزدیک‌تر است ولی تفاوت بین دو گروه ۳۸ و احتمالاً ۳۴ میومری مربوط به ارتفاع بدن، همانطور که دیده می‌شود گروه ۳۸ میومری بدن مرتفع‌تری دارد. گروه ۳۴ میومری گونه *S. sihama* می‌باشد. دو گروه ۳۸ و احتمالاً ۳۴ میومری احتمالاً دو گونه متفاوت می‌باشند (*S. arabaca* و *S. attenuata*). در بررسی‌های دیگر که با استفاده از روش خط شناسه‌گذاری DNA میتوکندری<sup>۱</sup> انجام شده است وجود ۳ گونه مذکور مشخص شده است (Amini et al., 2016).

در مرحله خمیدگی لندمارک‌هایی که بیشترین تغییرات را نشان می‌دهند (طبق آزمون PCA) بر لندمارک‌هایی که بین گروه‌ها تفاوت دارند (طبق آزمون DFA) منطبق نیستند. دو دلیل احتمالی برای این مسئله می‌تواند وجود داشته باشد. اول اینکه طبق بررسی‌های انجام شده نگهداری لاروها در محلول‌های تثبیت‌کننده مثل الکل و فرمالین بر ریخت کلی لاروها تأثیر منفی گذاشته و باعث ایجاد بد شکلی‌هایی می‌شود (Martinez et al., 2012) که این بدشکلی‌ها در تجزیه و تحلیل نتایج ریخت‌سنجی هندسی و تفسیر آنها خطاهای اساسی ایجاد می‌نماید. این روش به تغییرات جزئی ریخت بدن بسیار حساس است (Zale et al., 2012). دلیل دوم می‌تواند مربوط به خطا در شمارش میومرها و تشخیص اولیه لاروهای ۳۴ و ۳۸ میومری باشد. این خطا نیز به دلیل نگهداری لاروها در محلول‌های تثبیت‌کننده ایجاد می‌شود. این محلول‌ها به‌ویژه الکل اتیلیک باعث کدر شدن بدن لارو شده و شمارش میومرها را مشکل می‌کند. در هر

## 1. DNA Barcoding

صورت اگر نتایج حاصل از آزمون PCA را مینا قرار دهیم در لاروهای این مرحله نیز موقعیت مخرج و انتهای نوتوکورد می‌تواند به‌عنوان ویژگی اصلی در شناسایی لاروها به‌کار رود. در مرحله پیش‌خمیدگی به‌دلیل ظرافت بدن امکان شمارش میومرها وجود نداشت بنابراین جدا سازی لاروهای ۳۴ و ۳۸ میومری انجام نشد. اما نتایج آزمون PCA در این گروه نیز مشخص نمود که موقعیت مخرج و همچنین ابتدا و انتهای بدن تغییرات بیشتری در نمونه‌ها نشان می‌دهد و بنابراین اهمیت بیشتری برای شناسایی لاروها دارند. در مجموع می‌توان ذکر نمود که موقعیت مخرج و در واقع نسبت فاصله نوک پوزه تا مخرج به مخرج تا انتهای نوتوکورد و ارتفاع بدن در لارو گونه‌های شوورت ماهی ایران می‌تواند برای شناسایی لاروها استفاده شود. البته این مقیاس در لاروهای بزرگ‌تر به‌ویژه مرحله پس‌خمیدگی با اطمینان بیشتری قابل استناد می‌باشد. توصیه می‌شود در صورت نیاز به شناسایی دقیق گونه‌ها، در مورد لاروهای کوچک‌تر از روش‌های ژنتیکی در کنار روش‌های ریختی استفاده شود.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان لازم می‌دانند از همه پرسنل پژوهشکده میگو کشور به‌ویژه آقای رسول غلام‌نژاد برای همکاری در نمونه‌برداری لاروها تشکر نمایند.

#### منابع

- Amini M., Ghorbani R., Shabani A., Rabhaniha M., Noorinejad M., Naddafi R., Kolangi Miandarreh H. 2016. Species identification of Sillaginid larvae (Perciformes: Sillaginidae) in the central creeks of Persian Gulf using morphological and DNA barcoding methods. Iranian Scientific Fisheries Journal, 25(1): 1-9. (In Persian).
- Ara R., Amin S.M.N., Mazlan A.G., Arshad A. 2013. Morphometric variation among six families of larval fishes in the seagrass-mangrove ecosystem of Gelang Patah, Johor, Malaysia. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 8(2): 247-256.
- Bani A., Toorchi M., Norouzi N. 2015. Morphometric and meristic variations in bream (*Abramis brama orientalis*, Berg, 1949) during larval development. Caspian Journal of Environmental Science, 13: 89-97.
- Cadrin S.X., Kerr L.A., Mariani S. 2014. Stock Identification Methods, Applications in Fishery Science, 2<sup>nd</sup> Edition. Elsevier. 566 P.
- Di'az-Viloria N., Sa' nchez-Velasco L., Perez-Enriquez R. 2005. Inhibition of DNA amplification in marine fish larvae preserved in formalin. Journal of Plankton Research, 27(8): 787-792.

- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1): 1-9.
- Hubert N., Delrieu-Trottin E., Irisson J.O., Meyer C., Planes S. 2010. Identifying coral reef fish larvae through DNA barcoding: A test case with the families Acanthuridae and Holocentridae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 1195–1203.
- Hutchinson W.F., Carvalho G.R., Rogers S.I. 2001. Marked genetic structuring in localised spawning populations of cod *Gadus morhua* in the North Sea and adjoining waters, as revealed by microsatellites. *Marine Ecology Progress Series*, 223: 251-260.
- Ibañez A.L., Cowx I.G., 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 Sciences*, 64: 1091-1100.
- Kelso W.E., Kaller M.D., Rutherford D.A. 2012. Collecting, Processing, and Identification of Fish Eggs and Larvae and Zooplankton. In: Zale AV, Parrish DL, Sutton TM (Eds.). *Fisheries techniques*, 3<sup>rd</sup> edition. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, pp: 363-452.
- Klingenberg C.P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11: 353-357.
- Koochaknejad E., Savari A., Dehghan-Madiseh S., Eskandari G., Sakhaiee N. 2011. Fish Larvae assemblage in the northwestern coast of the Persian Gulf Khure Mussa Channel. *Journal of the Persian Gulf (Marine Science)*, 2(3): 25-29.
- Leis J.M., Carson-Ewart B.M. 2000. The larvae of Indo-Pacific coastal fishes (An identification guide to marine fish larvae). Brill, 850 P.
- Martinez P.A., Berber-Filho W.M., Jacobina U.B. 2012. Is formalin fixation and ethanol preservation able to influence in geometric morphometric analysis? Fishes as a case study. *Zoomorphology*, 132: 87-93.
- McKay R.J. 1992. Sillaginid fishes of the world. (Family Sillaginidae). An Annotated and Illustrated Catalogue of the Sillago, Smelt or Indo-Pacific Whiting Species Known to Date. *FAO Fisheries Synopsis*, 125(14), 87 P.
- Nelson J.S. 2006. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, New York, USA. 601 P.
- Paulic J.E., Papst M.H. 2012. Larval and early juvenile fish distribution and assemblage structure in the Canadian Beaufort Sea during July–August, 2005. *Journal of Marine Systems*, 127: 46-54.
- Ponton D., Carassou L., Raillard S., Borsa P. 2013. Geometric morphometrics as a tool for identifying emperor fish (Lethrinidae) larvae and juveniles. *Journal of Fish Biology*, 83: 14-27.
- Rabbania M., Seifabadi S.J., Sharifpour I., Owfi F. 2002. Frequency and diversity of ichthyoplankton in northern coasts of Bushehr province (Creek-Estuary of Farakeh

- to Genaveh Harbor). *Journal of Marine Science and Technology*, 2(4): 39-47. (In Persian).
- Richards W.J. 2008. Identification guide of the early life history stages of fishes from the waters of Kuwait in the Persian Gulf, Indian Ocean. Kuwait Institute for Scientific Research, 330 P.
- Rohlf F.J. 2010. tpsDIG2: Thin Plate Spline Digitizing Landmarks. 2.16 Edition. New York: State University of New York at Stony Brook, New York, USA.
- Schreck C.B., Moyle P.B. 1990. *Methods for fish biology*. American fisheries Society. Bethesda, Maryland, USA, 684 P.
- Webb K.E., Barnes D.K.A., Clark M.S., Bowden D.A. 2006. DNA barcoding, a molecular tool to identify Antarctic marine larvae. *Deep-Sea Research, part II*, 53(8-10): 1053-1060.
- Zale A.V., Parrish D.L., Sutton T.M. 2012. *Fisheries techniques*, 3rd edition. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA. 1069 P.

