

## بررسی جمعیت‌های مختلف منتسب به *Gammarus lordeganensis* با استفاده از روش

### ریخت‌سنجی هندسی

معصومه مهدیان، ولی‌الله خلجی پیربلوطی\*، خجسته ملک محمد و حمزه اورعی

ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۰۸

### چکیده

روش ریخت‌سنجی هندسی یک روش نوین در مطالعه ویژگی‌های ریختی دوجورپایان بویژه در تمایز و تفکیک گونه‌های مختلف جنس *Gammarus* است. از این‌رو این پژوهش با هدف بررسی جمعیت‌های مختلف منتسب به *G. lordeganensis* در استان چهارمحال بختیاری به کمک روش ریخت‌سنجی هندسی انجام شد. برای این منظور از صفحات اپیمرال سوم برای بررسی تفکیک جمعیت‌ها از پنج منطقه مختلف شامل چشمه برم، چشمه گردبیشه، چشمه سیله، چشمه سرداب رستم‌آباد واقع در استان چهارمحال و بختیاری استفاده شد. برای نتیجه‌گیری بهترگونه‌ی *G. parthicus* از چشمه سراب عباس آباد در استان مرکزی نیز به مطالعه افزوده شد. برای استخراج داده‌های ریختی از صفحات اپیمرال سوم عکس‌برداری شد. ۲ لندمارک و ۱۰ نیمه لندمارک با استفاده از نرم افزار TpsDig2 بر روی حاشیه‌های عقبی، جلویی و تحتانی صفحات اپیمرال سوم قرار داده شد. داده‌های حاصل پس از آنالیز پروکراست (GPA)، با روش‌های آماری چند متغیره تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA)، تجزیه هم‌بستگی کانونیک (CVA) و تحلیل خوشه‌ای با استفاده از نرم افزار PAST مورد تفسیر قرار گرفتند. نتایج نشان داد که جمعیت‌های مورد بررسی از لحاظ شکل صفحه اپیمرال سوم تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند ( $P < 0.001$ ) و به طور کامل از یکدیگر جدا شدند. شکل صفحه اپیمرال سوم یک صفت تشخیصی مناسب برای شناسایی و تفکیک گونه‌های *Gammarus* شبیه بهم از نظر ریختی است. براساس نتایج این مطالعه می‌توان بیان کرد که سایر جمعیت‌های منتسب به *G. lordeganensis* مورد بررسی در این پژوهش به این گونه تعلق نداشته و به وضوح گونه‌های مختلفی از *Gammarus* هستند.

واژه‌های کلیدی: *Gammarus lordeganensis*، ریخت‌سنجی هندسی، صفحه اپیمرال سوم

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۸۳۲۳۲۴۴۱۹، پست الکترونیکی: khalajiv@yahoo.com

### مقدمه

این جانداران به مواد سمی و آلاینده‌ها در بررسی آلودگی آب و ارزیابی کیفیت آب از آن‌ها استفاده می‌شود. از این رو بررسی این جانوران در اکوسیستم‌های آبی از اهمیت بالایی برخوردار است (۷). جنس *Gammarus* دارای پراکنش جهانی است و در آب‌های شیرین، دریایی و آب‌های زیرزمینی وجود دارد. این جنس با حداقل ۱۸ گونه معتبر ثبت شده در ایران دارای پراکنش وسیع بوده و دارای تنوع زیادی است (۲۰).

دوجورپایان یکی از متنوع‌ترین راسته‌های سخت پوستان هستند که به دلیل فراوانی زیاد به عنوان بازسازان زیست بوم بخش مهمی از شبکه غذایی آب شیرین و اکوسیستم‌های آبی را تشکیل می‌دهند (۳ و ۱۹). این جانوران غذای اصلی سرپایان، انواع مختلفی از ماهی‌ها و بسیاری از سخت‌پوستان بزرگ در زیستگاه‌های ساحلی هستند (۷). دوجورپایان به عنوان شاخص زیستی آلودگی آب نیز در نظر گرفته می‌شوند و به دلیل حساسیت بالایی

شکل صفحه اپیمرال سوم جمعیت‌های مختلف متناسب به *G. lordeganensis* در ایران، نپرداخته است.

بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی جمعیت‌های مختلف متناسب به *G. lordeganensis* در استان چهارمحال بختیاری به کمک روش ریخت‌سنجی هندسی انجام شد تا امکان تفکیک جمعیت‌ها با استفاده از شکل صفحه اپیمرال سوم بررسی شود.

### مواد و روشها

در این مطالعه، چهار جمعیت مختلف متناسب به *Gammarus lordeganensis* از چهار چشمه مختلف در استان چهارمحال و بختیاری و یک جمعیت از گونه‌ی *G. parthicus* در استان مرکزی مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های متناسب به *G. lordeganensis* از چشمه برم، چشمه سیله، چشمه رستم‌آباد و چشمه گردبیشه واقع در استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شدند (شکل ۱).



شکل ۱- نقشه استان چهارمحال و بختیاری و محل ایستگاه‌های نمونه‌برداری از جمعیت‌های متناسب به *G. lordeganensis*

هم‌چنین نمونه‌های *G. parthicus* از چشمه سراب عباس آباد (مکان تایپ نمونه) واقع در شهرستان شازند استان

برای اولین بار از ایران *G. lordeganensis* توسط خلجی پیربلوطی و ساری در سال ۲۰۰۴ از چشمه برم شهرستان لردگان (محل تایپ نمونه) در استان چهارمحال و بختیاری به عنوان منطقه‌ای منحصر به فرد از نظر تنوع زیستگاه و منابع آب در کوه‌های زاگرس مرکزی شناسایی و معرفی شد. این گونه همچنین از چشمه گردبیشه واقع در استان چهارمحال و بختیاری نیز گزارش شد (۱۱ و ۱۲). همچنین در یک مطالعه مولکولی این گونه از چشمه سرداب رستم آباد واقع در شهرستان اردل استان چهارمحال و بختیاری نیز گزارش شده است (۱۰).

یکی از روش‌های مطالعه ویژگی‌های ریختی دوجورپایان، روش ریخت‌سنجی هندسی می‌باشد (۵). در واقع ریخت‌سنجی هندسی یک روش نوین و قدرتمند در بررسی و مطالعه‌ی اشکال زیستی و مقایسه شکل موجودات است. این روش در پژوهش‌های بیوسیستماتیک یک ابزار تحلیلی مفید جهت تفکیک گونه‌ها و جمعیت‌ها براساس شباهت‌های ریختی است (۱ و ۴). روش ریخت‌سنجی هندسی در واقع یک تجزیه و تحلیل آماری تغییرات شکل است که از داده‌های لندمارک‌ها و نیمه لندمارک‌ها برای به دست آوردن اطلاعات هندسی ساختارهای زیستی استفاده می‌کند (۱۶ و ۱۷). مزیت مهم روش ریخت‌سنجی هندسی نسبت به ریخت‌سنجی سنتی آن است که اطلاعات شکل ساختارهای زیستی را در قالب شکل استخراج می‌کند و به صورت گرافیکی نمایش می‌دهد. مصورسازی گرافیکی نتایج در قالب شبکه‌های تغییر شکل به تفسیر بهتر داده‌ها و آنالیز آماری آسان‌تر آن‌ها کمک می‌کند (۲، ۹ و ۲۱). تاکنون این تکنیک با موفقیت برای تشخیص تفاوت بین گونه‌ها و جمعیت‌ها در تعدادی از گروه‌های جانوری، از جمله حشرات و سخت پوستان مختلف از جمله دوجورپایان و خرچنگ‌ها استفاده شده است (۸). با این وجود، نمونه‌هایی از کاربرد این تکنیک در تفکیک گونه‌های مختلف جنس *Gammarus* وجود ندارد. همچنین، هیچ مطالعه‌ای به بررسی تحلیل ریخت‌سنجی هندسی

انتخاب الگوریتم Paired group و درجه تشابه Eucilidean. توسط نرم افزار PAST نسخه ۳/۰۲ مورد تحلیل قرار گرفتند. تفاوت شکل حاشیه‌های مختلف صفحه اپیمرال سوم در جمعیت‌های تحت بررسی براساس شکل میانگین (Consensus configuration) هر گروه از جمعیت‌ها در تحلیل خوشه‌ای و همچنین انحراف از شکل میانگین حاشیه‌های عقبی، جلویی و تحتانی صفحات اپیمرال سوم جمعیت‌ها از یکدیگر با استفاده از شبکه تغییر شکل با استفاده از نرم‌افزارهای tpsSmall نسخه ۱/۲۰ و PAST بررسی شد (۱۸).

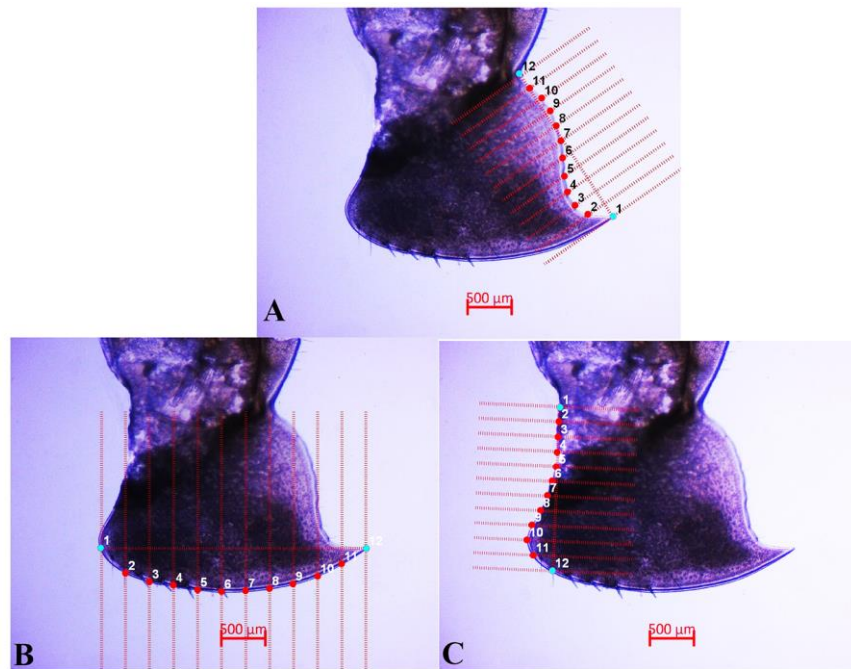
## نتایج

آزمون همبستگی فواصل پروکراست و تانژانت تناسب داده‌های روی هم‌گذاری شده را با همبستگی ۱ جهت انجام تحلیل‌های آماری تایید کرد. نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی، تغییرات شکل حاشیه‌های عقبی صفحه اپیمرال سوم را در دو مولفه اصلی ( $PC1=72/94$  و  $PC2=17/68$ ) با مجموع درصد ۹۰/۶۲ آشکار نمود.

براساس نتایج PCA هر پنج جمعیت مختلف از یکدیگر جدا شده‌اند (شکل ۳) و میان جمعیت‌های مختلف به لحاظ شکل حاشیه عقبی صفحه اپیمرال سوم تفاوت معناداری وجود دارد ( $P<0/005$ ). نتایج آنالیز واریانس چندمتغیره (MANOVA) نشان داد که تفاوت معنی داری بین جمعیت‌های مورد مطالعه از نظر شکل حاشیه عقبی صفحه اپیمرال سوم وجود دارد ( $P<0/001$ ). باتوجه به نمودار تحلیل تجزیه همبستگی کانونیک (CVA) پنج جمعیت مورد مطالعه را به طور کامل از یکدیگر مجزا شده‌اند (شکل ۳). تحلیل همبستگی کانونیک براساس ارزش P حاصل از آزمون جایگشت (Permutation Test) نشان داد که ۹۰/۲۶ درصد واریانس مربوط به دو مولفه اول است به طوری که هر یک بترتیب ۷۹/۳۳ و ۱۰/۹۳ درصد از واریانس را به خود اختصاص داده‌اند.

مرکزی جمع آوری گردیده، سپس در الکل ۹۶ درصد تثبیت شده و برای ادامه مطالعات به آزمایشگاه جانورشناسی دانشگاه شهرکرد منتقل شدند.

شکل صفحه‌ی اپیمرال سوم به عنوان یک صفت آرایه شناختی مهم جهت مطالعه‌ی جمعیت‌های مختلف متناسب به *G. lordeganensis* برای تجزیه و تحلیل ریخت‌سنجی هندسی مبتنی بر مختصات لندمارک‌ها انتخاب شد، زیرا این قطعه آناتومیکی در گونه‌های مختلف دارای اشکال متنوع و مختلفی است (۵). بدین منظور، از هر جمعیت ۱۳ نمونه جنس نر *Gammarus* را برداشته و صفحه اپیمرال سوم آن‌ها را جدا کرده، سپس تصاویر دیجیتالی صفحات اپیمرال سوم با استفاده از یک دوربین Zeiss نصب شده بر روی میکروسکوپ Carl Zeiss (AxioCam ERc 5s ZEISS) مجهز به یک سیستم تصویربرداری و متصل به کامپیوتر با بزرگ‌نمایی ۳/۲ تهیه شدند. برای استخراج داده‌های شکل صفحات اپیمرال، بر روی حاشیه‌های عقبی، جلویی و تحتانی هر یک از تصاویر صفحات اپیمرال ابتدا با استفاده از نرم افزار MakeFan نسخه شش خطوط موازی با فاصله‌های یکسان رسم شد. تعداد ۲ لندمارک و ۱۰ نیمه لندمارک با استفاده از نرم افزار TpsDig2 بر روی حاشیه‌های عقبی، جلویی و تحتانی صفحات اپیمرال سوم به صورت جداگانه قرار داده شد (شکل ۲). آنالیز پروکراست (GPA) با هدف حذف اختلافات غیرشکل از جمله جهت، موقعیت و مقیاس و همچنین روی هم گذاری جایگاه لندمارک‌های نمونه‌ها انجام شد (۲۲). سپس داده‌های حاصل از شکل حاشیه‌های مختلف صفحات اپیمرال جمعیت‌های مختلف مورد مطالعه به طور جداگانه با استفاده از آنالیز تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) با هدف بررسی تنوع و تغییر شکل جمعیت‌های مورد مطالعه، آنالیز واریانس چند متغیره / تحلیل همبستگی کانونیک (MANOVA/CVA) بمنظور مطالعه حداکثر جدایی و تفکیک بین جمعیت‌ها، و آنالیز خوشه‌ای با هدف درک شباهت شکل صفحات اپیمرال جمعیت‌های مورد مطالعه با



شکل ۲- جایگاه ۲ لندمارک (لندمارک‌های شماره ۱ و ۱۲) و ۱۰ نیمه لندمارک (نیمه لندمارک‌های شماره ۲ تا ۱۱) تعیین شده بر روی شکل صفحه اپیمرال سوم، (A) حاشیه عقبی، (B) حاشیه تحتانی، و (C) حاشیه جلویی

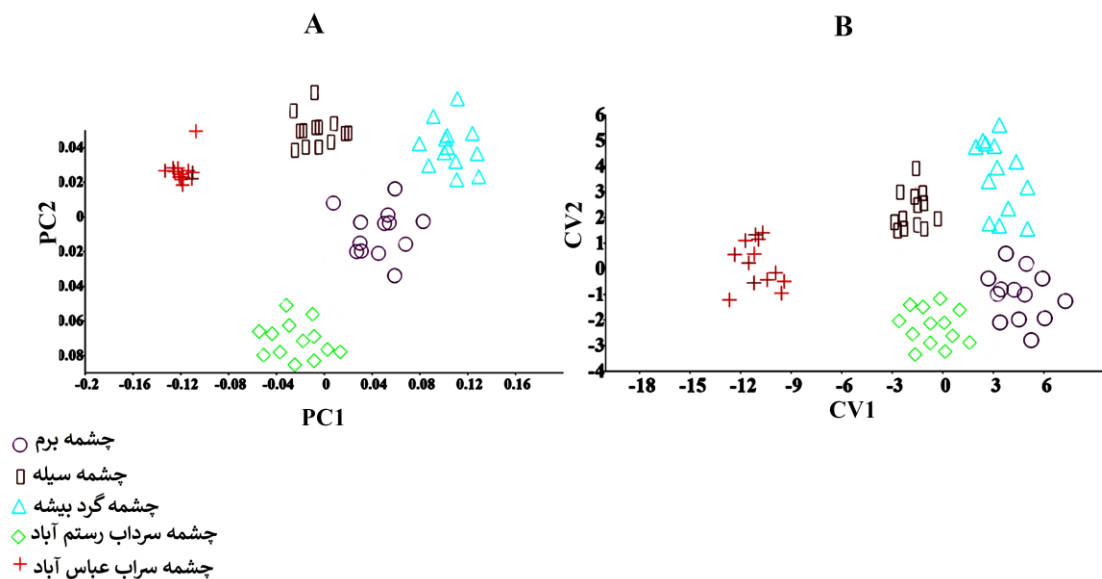
تشابه Euclidean ترسیم شده است. ضریب کوپرنیک تحلیل خوشه‌ای برابر با  $0/8927$  محاسبه شد. همانطور که در شکل مشخص است، جمعیت‌های چشمه سیله، چشمه برم، چشمه رستم آباد و چشمه گردبیشه با ضریب حمایت ۹۹ درصد در یک گروه قرار گرفتند و جمعیت چشمه سراب عباس آباد (*G. parthicus*) با بیشترین تمایز از چهار جمعیت منتسب به *G. lordeganensis* جدا و در یک گروه دیگر قرار گرفت. شکل صفحات اپیمرال سوم جمعیت‌های مختلف مورد مطالعه در شکل ۶ نشان داده شده است.

آزمون همبستگی فواصل پروکراست و تانژانت تناسب داده‌های روی هم‌گذاری شده را با همبستگی ۱ جهت انجام تحلیل‌های آماری تأیید کرد. تحلیل تجزیه به مولفه‌های اصلی شکل حاشیه‌ی جلویی صفحه اپیمرال سوم تغییرات شکل حاشیه جلویی صفحه اپیمرال سوم را در سه مولفه اصلی ( $PC1=45/05$ ،  $PC2=35/86$  و  $PC3=8/33$ ) آشکار نمود. این سه مولفه در مجموع  $89/24$  درصد واریانس را به خود اختصاص دادند.

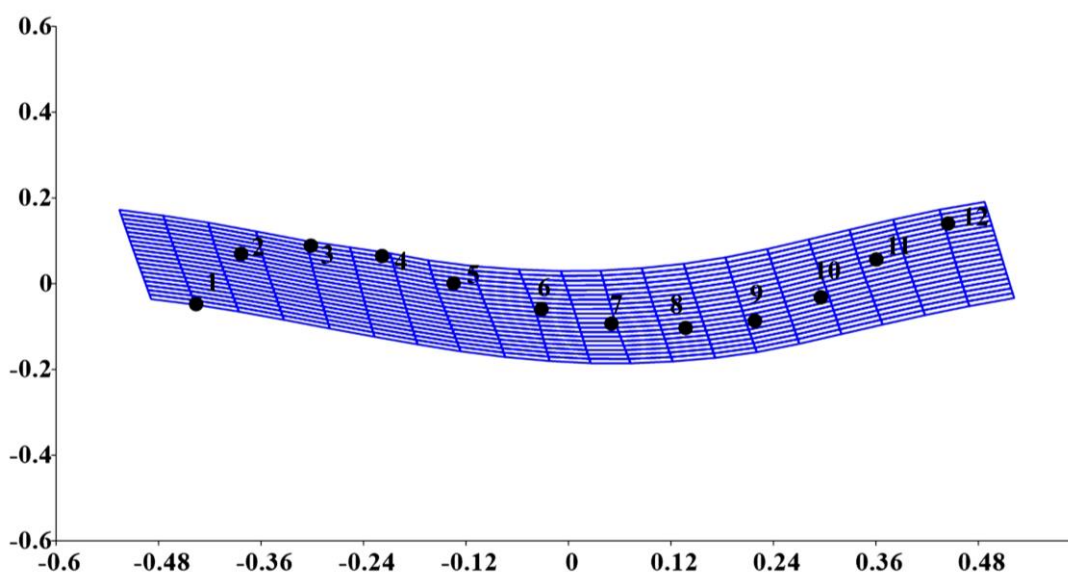
بر اساس این تحلیل تفاوت معناداری بین شکل حاشیه عقبی صفحه اپیمرال سوم میان جمعیت‌های مختلف وجود داشت ( $P < 0/001$ ،  $F=10/89$  و  $Wilks \lambda = 0/0005447$ ).

شبکه تغییر شکل و تغییرات شکل حاشیه عقبی صفحه اپیمرال سوم جمعیت‌های مورد مطالعه در شکل ۴ آمده است. با توجه به شکل ۴، لندمارک‌های ۱ و ۱۲ و نیمه لندمارک‌های ۵، ۶، ۷ و ۸ تغییرات زیادی داشتند و در بین جمعیت‌ها دارای تفاوت بیشتری بودند. تغییرات نیمه لندمارک‌های ۵، ۶، ۷ و ۸ در جمعیت‌های مختلف نشان‌دهنده جابجایی نیمه لندمارک‌ها در جهت خارج یعنی به سمت تحدب و برآمدگی بیشتر شکل حاشیه عقبی صفحه اپیمرال است. تغییرات لندمارک‌های ۱ و ۱۲ در جمعیت‌های مختلف بترتیب نشان دهنده‌ی جابجایی لندمارک به سمت نوک تیز بودن و فرم سینوسی شکل بیشتر حاشیه‌ی عقبی صفحه اپیمرال است.

تحلیل خوشه‌ای جمعیت‌های مورد مطالعه که در شکل ۵ نشان داده شده است براساس فاصله اقلیدسی یا درجه



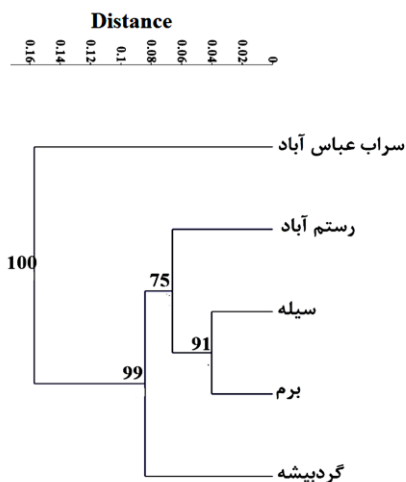
شکل ۳- نمودار تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA)، (B) نمودار تحلیل هم‌بستگی کانونیک (CVA) شکل حاشیه عقبی صفحه اپیمرال سوم جمعیت‌های مختلف



شکل ۴- شبکه تغییر شکل و تغییرات شکل حاشیه عقبی صفحه اپیمرال سوم جمعیت‌های مختلف

نتایج تحلیل واریانس چندمتغیره تفاوت معناداری بین شکل حاشیه جلویی صفحه اپیمرال سوم جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داد ( $P < 0.001$ ). با توجه به نمودار تجزیه هم‌بستگی کانونیک پنج جمعیت به طور کامل از یکدیگر

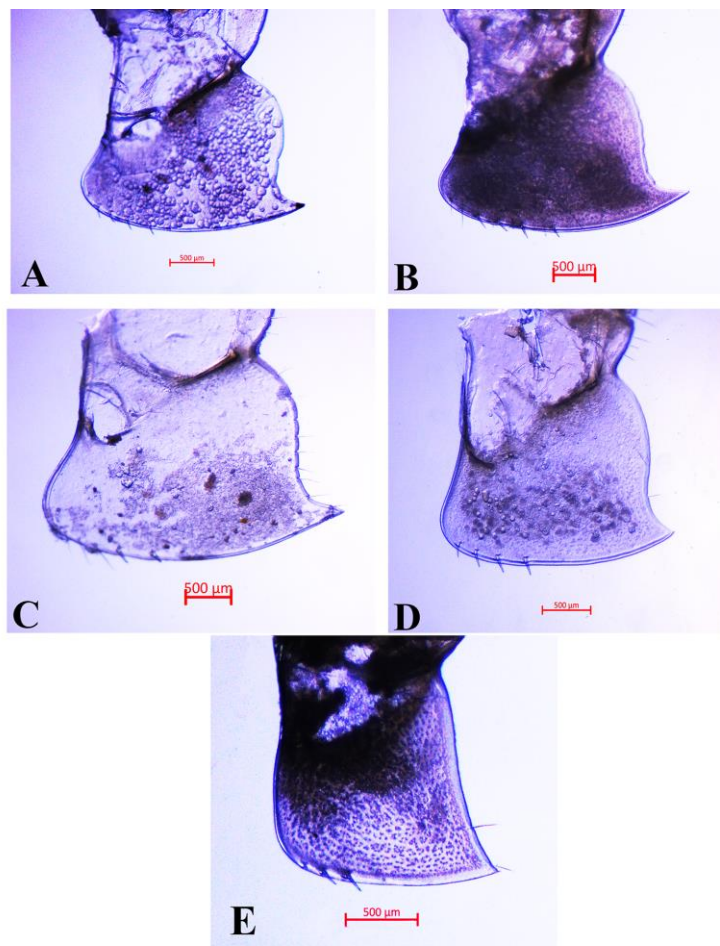
باتوجه به نتایج PCA، جمعیت‌های مختلف مورد بررسی تا حدودی با یکدیگر هم‌پوشانی دارند (شکل ۷) و تفاوت معنی‌داری بین جمعیت‌های مختلف از نظر شکل حاشیه جلویی صفحه اپیمرال سوم وجود ندارد ( $P > 0.05$ ).



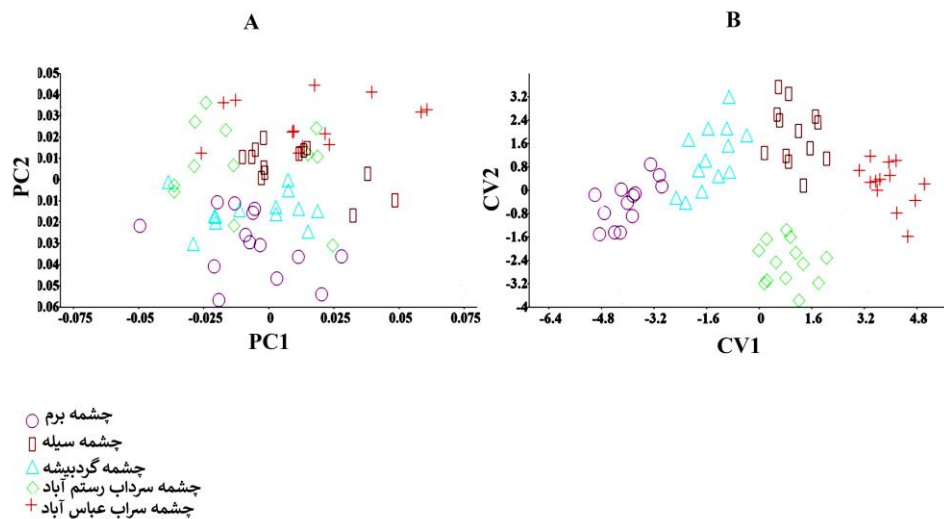
شکل ۵- نمودار تحلیل خوشه‌ای شکل حاشیه عقبی صفحه اپیمرال سوم در جمعیت‌های مختلف

متمایز شده‌اند (شکل ۷). تحلیل همبستگی کانونیک براساس ارزش P حاصل از آزمون جایگشت نشان داد که ۸۴/۵۰ درصد واریانس مربوط به دو مولفه اول است به طوری که هر یک بترتیب ۶۶/۰۸ و ۱۸/۴۲ درصد از واریانس را به خود اختصاص داده‌اند. براساس این تحلیل تفاوت معناداری بین شکل حاشیه عقبی صفحه اپیمرال سوم میان جمعیت‌های مختلف وجود داشت ( $P < 0.001$ , Wilks lambda = 0.01172 و  $F = 5/41$ ).

شبکه تغییر شکل و تغییرات شکل حاشیه‌ی جلویی صفحه اپیمرال سوم جمعیت‌های مختلف در شکل ۸ نشان داده شده است. نیمه لندهمارک‌های ۹.۸، ۷ و ۱۱ و لندهمارک ۱۲ در بین جمعیت‌ها دارای تفاوت بیشتری بودند.



شکل ۶-A-D: شکل صفحات اپیمرال سوم جمعیت‌های مختلف متناسب به *G. lordeganensis* (A چشمه گردبیشه، B چشمه برم، C چشمه سرداب رستم آباد، D چشمه سیله و E *G. parthicus* از چشمه سراب عباس آباد)



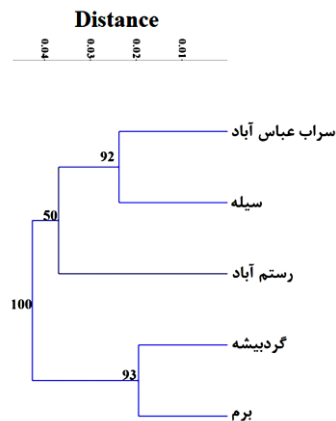
شکل ۷- A) نمودار تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA)، B) نمودار تحلیل هم‌بستگی کانونیک (CVA) شکل حاشیه جلویی صفحه اپیمرال سوم جمعیت‌های مختلف

تغییرات نیمه لندمارک‌های مذکور و لندمارک شماره ۱۲ نشان‌دهنده جابجایی آن‌ها به سمت خارج یعنی حاشیه‌ی جلویی-تحتانی جمعیت‌های مورد بررسی لوب‌دار شده است. برطبق آنالیز خوشه‌ای که براساس درجه تشابه Eucilidean بدست آمده است (شکل ۹)، جمعیت‌های متناسب به *G. lordeganensis* از چشمه سرداب رستم‌آباد و چشمه سیله با جمعیت *G. parthicus* از چشمه سراب عباس آباد با ضریب حمایت ۵۰ درصد در یک شاخه و جمعیت‌های چشمه برم و چشمه گردبیشه در شاخه دیگر با ضریب حمایت ۹۳ درصد قرار گرفته‌اند. ضریب کوپرنیک تحلیل خوشه‌ای ۰/۹۶۳ محاسبه شده است.

آزمون همبستگی فواصل پروکراست و تانژانت تناسب داده‌های روی هم‌گذاری شده را با همبستگی ۱ جهت انجام تحلیل‌های آماری تأیید کرد. نتایج آنالیز تجزیه به مولفه‌های اصلی تغییرات شکل حاشیه‌ی تحتانی صفحه اپیمرال سوم را در دو مولفه‌ی اصلی ( $PC1=71/33$  و  $PC2=12/38$ ) در مجموع با ۸۳/۷۱ درصد مشخص نمود. مطابق با شکل ۱۰، جمعیت‌های چشمه گردبیشه، برم، سیله و سراب عباس آباد با یکدیگر هم‌پوشانی دارند. جمعیت

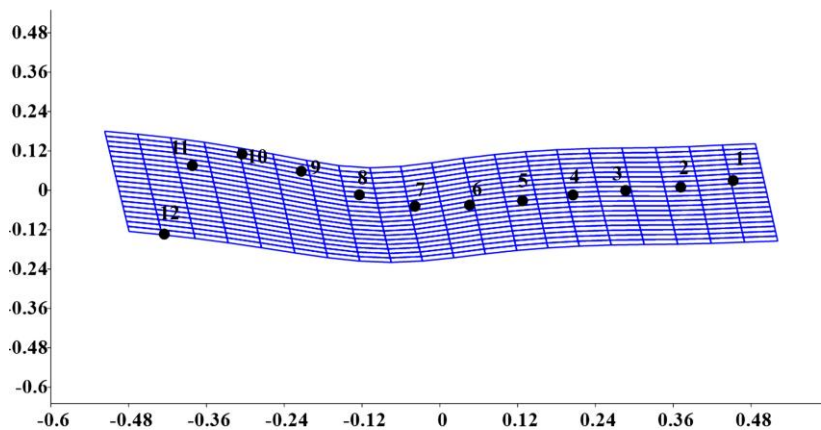
چشمه رستم آباد از سایر جمعیت‌ها جدا شد و تفاوت معناداری با سایر جمعیت‌ها دارد ( $P<0/005$ ). نتایج آنالیز واریانس چند متغیره تفاوت معناداری را بین جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داد ( $P<0/001$ ). برطبق نتایج تحلیل تجزیه هم‌بستگی کانونیک همه‌ی جمعیت‌ها تا حد زیادی از یکدیگر جدا شدند (شکل ۱۰). تحلیل همبستگی کانونیک براساس ارزش  $P$  حاصل از آزمون جایگشت نشان داد که ۷۹/۱۹ درصد واریانس مربوط به دو مولفه اول است به طوری که هر یک بترتیب ۴۱/۳۰ و ۳۷/۸۹ درصد از واریانس را به خود اختصاص داده‌اند. براساس این تحلیل تفاوت معناداری بین شکل حاشیه عقبی صفحه اپیمرال سوم میان جمعیت‌های مختلف وجود داشت ( $P<0/001$ ،  $F=6/20$  و  $Wilks\ lambda=0/008115$ ).

تفاوت و تغییرات شکل حاشیه تحتانی صفحه اپیمرال سوم جمعیت‌های مورد مطالعه در شکل ۱۱ ارائه شده است. لندمارک‌های شماره ۱ و ۱۲ تغییرات زیادی داشتند و در بین جمعیت‌ها دارای تفاوت بیشتری بودند. تغییرات لندمارک‌های ۱ و ۱۲ در جمعیت‌های مختلف بترتیب نشان دهنده‌ی جابجایی لندمارک به سمت نوک تیز بودن حاشیه‌ی عقبی-تحتانی و لوب‌دار شدن حاشیه‌ی جلویی-تحتانی صفحه اپیمرال سوم است.

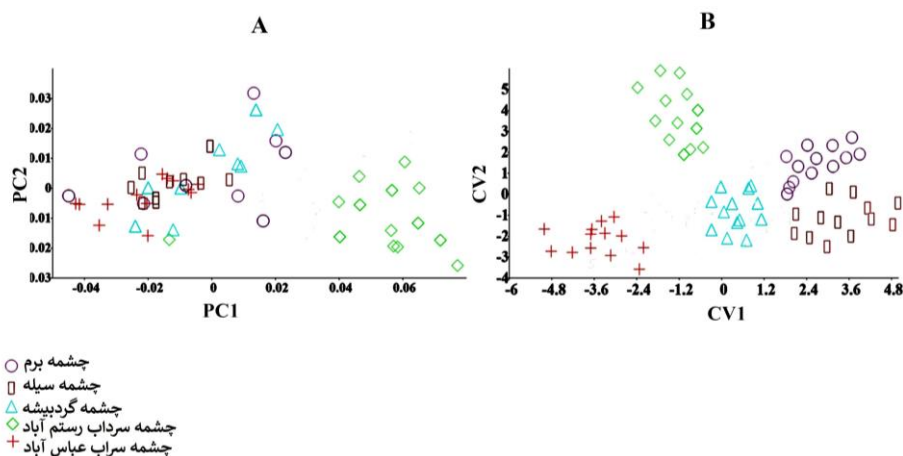


شکل ۹- نمودار تحلیل خوشه‌ای شکل حاشیه جلویی صفحه ایمرال سوم در جمعیت‌های مختلف

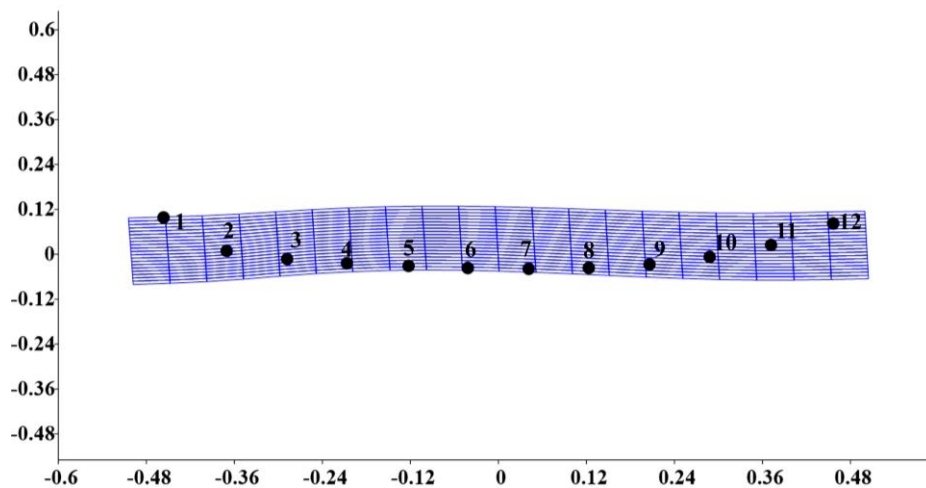
تحلیل خوشه‌ای جمعیت‌های مورد مطالعه براساس درجه تشابه Euclidean در شکل ۱۲ نشان داده شده است. ضریب کوپرنیک تحلیل خوشه‌ای ۰/۹۸۳ محاسبه شده است همانطور که در شکل مشخص است، جمعیت‌های چشمه سیله، چشمه برم و چشمه گردبیشه با ضریب حمایت ۹۶ درصد در یک گروه قرار گرفتند و جمعیت چشمه سراب عباس آباد و جمعیت چشمه رستم آباد با بیشترین تمایز از سه جمعیت دیگر جدا و هرکدام در یک گروه مجزا قرار گرفتند.



شکل ۸- شبکه تغییر شکل و تغییرات شکل حاشیه جلویی صفحه ایمرال سوم جمعیت‌های مختلف

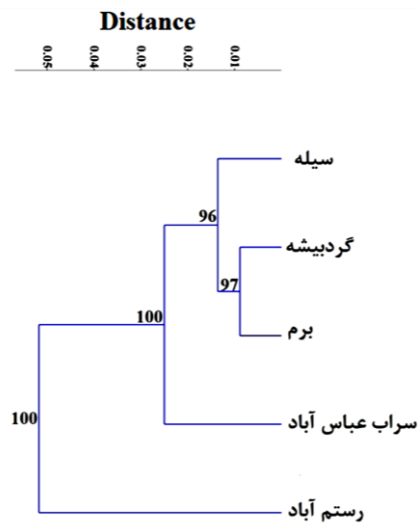


شکل ۱۰- نمودار تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA)، (B) نمودار تحلیل هم‌بستگی کانونیک (CVA) شکل حاشیه تحتانی صفحه ایمرال سوم جمعیت‌های مختلف



شکل ۱۱- شبکه تغییر شکل و تغییرات شکل حاشیه تحتانی صفحه اپیمرال سوم جمعیت‌های مختلف

چشمه برم، چشمه سیله، چشمه گردبیشه و چشمه سرداب رستم آباد وجود دارد. علاوه بر این تفاوت معناداری نیز بین جمعیت‌های مورد مطالعه از استان چهارمحال و بختیاری با نمونه‌های *G. parthicus* از چشمه سراب عباس آباد در استان مرکزی وجود دارد. این تفاوت‌ها در شکل حاشیه‌های عقبی، جلویی و تحتانی صفحه اپیمرال سوم می‌تواند جمعیت‌های مورد بررسی را به طور کامل از هم جدا کند. عمده‌ی این تفاوت‌ها مربوط به نوک تیز بودن و فرم سینوسی شکل حاشیه‌ی عقبی و هم‌چنین لوب‌دار شدن حاشیه‌ی جلویی صفحه اپیمرال سوم است. نتایج ریخت‌سنجی هندسی شکل حاشیه‌ی عقبی صفحه‌ی اپیمرال سوم براساس تحلیل تجزیه به مولفه‌های اصلی، تحلیل تجزیه هم‌بستگی کانونیک و تحلیل خوشه‌ای نشان داد که کلیه جمعیت‌ها به وضوح از یکدیگر جدا شده‌اند و هیچ‌گونه هم‌پوشانی با هم ندارند. علت تفکیک و عدم هم‌پوشانی این جمعیت‌ها از یکدیگر را می‌توان شکل متفاوت حاشیه‌ی عقبی از نظر حالت سینوسی شکل و نوک تیز بودن آن‌ها عنوان کرد. به طوری که حاشیه عقبی صفحه اپیمرال سوم جمعیت‌های چشمه برم، گردبیشه و سرداب رستم آباد تحدد بیشتر نسبت به جمعیت چشمه سیله دارند و حاشیه عقبی جمعیت چشمه سراب عباس آباد نسبتاً صاف بوده و هیچ تحددی ندارد. هم‌چنین حاشیه



شکل ۱۲- نمودار تحلیل خوشه‌ای شکل حاشیه تحتانی صفحه اپیمرال سوم در جمعیت‌های مختلف

## بحث و نتیجه گیری

ریخت‌سنجی هندسی مبتنی بر لندمارک یک روش مدرن برای آشکارسازی تفاوت‌های ریختی اشکال زیستی است که جهت تفکیک گونه‌ها و تحلیل تغییرات شکل بین جمعیت‌های مختلف استفاده می‌شود (۱۳ و ۱۴).

مطالعه حاضر با هدف بررسی جمعیت‌های مختلف متناسب به *G. lordeganensis* با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی شکل صفحات اپیمرال سوم انجام شد. نتایج نشان داد که تفاوت معناداری میان جمعیت‌های مورد مطالعه از

مختلف و تفاوت ساختارهای زیستی نشان داده‌اند (۶ و ۱۵).

در بررسی خلجی پیربلوطی و ساری (۲۰۰۴) *G. lordeganensis* علاوه بر چشمه برم که محل تایپ نمونه است از چشمه گرد بیشه نیز گزارش شده است (۱۱). همچنین در مطالعه مولکولی کاتوزیان و همکاران (۲۰۱۶) این گونه از چشمه سرداب رستم‌آباد گزارش شده است (۱۰). در حالی که این نتایج با توجه به تفکیک جمعیت‌های مختلف در تحلیل ریخت‌سنجی هندسی و وجود تفاوت معنی‌دار بین جمعیت‌های مورد بررسی نشان داد که جمعیت‌های چشمه گرد بیشه و چشمه سرداب رستم‌آباد *G. lordeganensis* نیستند و گونه‌های مجزایی می‌باشند و *G. lordeganensis* فقط در چشمه برم لردگان پراکنش دارد. به نظر می‌رسد در مطالعه مولکولی کاتوزیان و همکاران (۲۰۱۶) به دلیل عدم استفاده از نمونه‌های تایپ از چشمه برم و براساس صفات ظاهری ریختی نمونه‌های چشمه سرداب رستم‌آباد به اشتباه *G. lordeganensis* شناسایی شده‌اند (مطالعات مولکولی در حال انجام نیز متفاوت بودن این دو جمعیت را نشان می‌دهد). براساس یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تحلیل ریخت‌سنجی هندسی شکل صفحه‌ی اپیمرال سوم به خصوص شکل حاشیه‌ی عقبی صفحه به عنوان یک صفت تاکسونومیکی تشخیصی، یک روش مناسب جهت شناسایی و تفکیک گونه‌های دوجورپایان است. هم‌چنین به عنوان یک نتیجه‌ی کلی می‌توان بیان داشت که جمعیت‌هایی که از گونه *G. lordeganensis* گزارش شده‌اند، متعلق به این گونه نمی‌باشند و به وضوح گونه‌های مختلف و مجزایی هستند.

عقبی صفحه اپیمرال سوم جمعیت چشمه برم بسیار نوک تیز، جمعیت‌های سرداب رستم‌آباد و چشمه گرد بیشه نسبتاً نوک تیز و حاشیه عقبی -تحتانی جمعیت چشمه سیله و چشمه سراب عباس‌آباد تیزی کمتری نسبت به سایر جمعیت‌ها دارند. در مطالعه‌ی Curatolo و همکاران (۲۰۱۳) نیز می‌توان نتایج مشابهی را مشاهده کرد. آن‌ها شکل حاشیه عقبی صفحه اپیمرال سوم را به عنوان یک صفت تشخیصی برای تمایز بین گونه‌های *Bathyporeia* با روش ریخت‌سنجی هندسی مورد بررسی قرار دادند. نتایج بررسی آن‌ها تغییرات شکل حاشیه‌ی عقبی صفحات اپیمرال سوم را در دو مولفه با مجموع ۸۹/۷۶ درصد واریانس آشکار نمود و مشخص گردید که روش ریخت‌سنجی هندسی به شناسایی و تفکیک گونه‌های *Bathyporeia* کمک کرد (۵). این نتایج به نوبه‌ی خود تأیید کننده‌ی انتخاب صحیح صفت تاکسونومیکی (شکل صفحه اپیمرال سوم) بویژه شکل حاشیه‌ی عقبی آن جهت تفکیک جمعیت‌ها به لحاظ ریختی است. مطالعه حاضر مشخص کرد که جمعیت‌های مختلف تا حد زیادی براساس آنالیز PCA شکل حاشیه‌ی جلویی و حاشیه تحتانی صفحه اپیمرال سوم هم‌پوشانی دارند. در نتیجه می‌توان بیان کرد که شکل حاشیه‌ی جلویی و تحتانی صفحه اپیمرال سوم، صفات تاکسونومیکی مناسبی جهت تفکیک گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف نیستند.

همانطور که این پژوهش نشان داد که روش ریخت‌سنجی هندسی روشی مناسب برای تجزیه و تحلیل شکل، جداسازی گونه‌ها و مطالعه تغییرات ریختی در این گروه از دوجورپایان است. مطالعات مختلفی نیز استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی را در سخت‌پوستان مختلف جهت شناسایی گونه‌ها، تشخیص تفاوت‌های ریختی گونه‌های

## منابع

1. Adams, D.C., Rohlf, F.J., and Slice D.E., 2004. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'Revolution', Italian Journal of Zoology, 71, PP: 5-16.
2. Adams, D.C., Rohlf, F.J., and Slice, D.E., 2013. A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century, Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy, 24, PP: 7-14.

3. Browne, W.E., Price, A.L., Gerberding, M., and Patel, N.H., 2005. Stages of Embryonic Development in the Amphipod Crustacean, *Parhyale hawaiiensis*. *Genesis*, 42, PP: 127-149.
4. 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, PP: 470-487.
5. Curatolo, T., Calvaruso, C., Galil, B., and Brutto, S., 2013. Geometric morphometry supports a taxonomic revision of the Mediterranean *Bathyporeia guilliamsoniana* (Spence Bate, 1857) (Amphipoda, Bathyporeiidae). *Crustaceana*, 86, PP: 820-828.
6. Diawol, V.P., Giri, F., and Collins, P.A., 2015. Shape and size variations of *Aegla uruguayana* (Anomura, Aeglidae) under laboratory conditions: A geometric morphometric approach to the growth, *Iheringia Sér Zool*, 105, PP: 76-83.
7. Escobar-Briones, E., and Winfield, I., 2003. Checklist of the Benthic Gammaridea and Caprellidea (Crustacea: Peracarida: Amphipoda) from the Gulf of Mexico Continental Shelf and Slope. *Belgian Journal of Zoology*, 133, PP: 37-44.
8. Grinang, J., Das, I., and Ng, P.K.L., 2019. Geometric morphometric analysis in female freshwater crabs of Sarawak (Borneo) permits addressing taxonomy-related problems, *PeerJ*, 7, e6205.
9. Ibanez, A.L., Cowx, I.G., and O'Higgins, P., 2007. Geometric morphometric analysis of fish scale for identifying genera, species and local populations within the Mugilidae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 64, PP: 1091-1100.
10. Katouzian, A.R., Sari, A., Macher, J.N., Weiss, M., Saboori, A., Leese, F., and Weigand, A.M., 2016. "Drastic underestimation of amphipod biodiversity in the endangered Irano-Anatolian and Caucasus biodiversity hotspots", *Scientific Report*, 6, 22507 p.
11. Khalaji-Pirbalouty, V., and Sari, A., 2004. Biogeography of amphipods (Crustacea: Amphipoda: Gammaridae) from the central Zagros Mountains, Iran, with descriptions of two new species. *Journal of Natural History*, 38, PP: 2425-2445.
12. Khalaji-Pirbalouty, V., and Sari, A., 2006. Description of *Gammarus balutchi* spec. nov. (Amphipoda: Gammaridae) from Iran, based on light and electron microscopy, *Zoologische Mededelingen Leiden*, 80, PP: 91-100.
13. Mouludi Saleh, A., and Keivany, Y., 2019. Comparison of Transcaucasian Chub (*Squalius turcicus* De Filippi, 1865) populations in southwestern Caspian Sea basin using geometric morphometric method, *Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology)*, 32, PP: 197-205.
14. Razavi Pour, P., Eagderi, S., Poorbagher, H., and Keivany, Y., 2015. Phenotypic plasticity of the Tuini fish, *Capoeta damascina* (Actinopterygii: Cyprinidae) populations in Iranian part of Tigris basin using geometric morphometric approach, *Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology)*, 28, PP: 170-179.
15. Riedlecker, E., Ashton, G., and Ruiz, G., 2009. Geometric morphometric analysis discriminates native and non-native species of Caprellidae in Western North America, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89, PP: 535-542.
16. Rohlf, F.J., 2001. Comparative methods for the analysis of continuous variables: Geometric Interpretations. *Evolution*, 55, PP: 2143-2160.
17. Rohlf, F.J., and Marcus, L.F., 1993. A revolution in morphometrics, *Trends in Ecology and Evolution*, 8, PP: 129-132.
18. Rohlf, F.J., 2003. tpsmal, thin-plate spline, version 1.20. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
19. Vainola, R., Witt, J.D.S., Grabowski, M., Bradbury, J.H., Jazdzewski, k., and Sket, B., 2008. Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595, PP: 241-255.
20. Zamanpoore, M., Grabowski, M., Poeckl, M., and Schiemer, F., 2011. Taxonomic review of freshwater *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda) from Iran. *ZooTaxa*, 3140, PP: 1-14.
21. Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., and Sheets, H.D., 2012. *Geometric Morphometrics for biologists: a primer*, Elsevier Academic Press, London.
22. Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D., and Fink, W.L., 2004. *Geometric Morphometrics for biologists: a primer*, Elsevier Academic Press, London.

## Investigation of different populations related to *Gammarus lordeganensis* using geometric morphometric method

Mahdian M., Khalaji-Pirbalouty V.,\* Malekmohammad K., and Oraei H.

Dept. of Biology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran

### Abstract

The Geometric morphometric method is a novel method in the studying of Amphipoda morphological characters, especially for the discrimination and separation of the different *Gammarus* species. Hence, this research was conducted to study the different populations related to *G. lordeganensis* in Chaharmahal va Bakhtiari province using geometric morphometric method. For this purpose, the third epimeron were used to investigate the separation of populations from five different localities, including Barm, Gerdebishe, Sileh and Sardabe Rostamabad springs in Chaharmahal va Bakhtiari province. For better conclusion, *G. parthicus* from Sarab Abbasabad spring in Markazi province was added to this study. Photographs were taken from the third epidermal plate (Ep3) to extract morphological data. Then, two landmarks and 10 semi-landmarks were digitized on the posterior, anterior and inferior margins of the Ep3 using the TpsDig2 software. After Generalized Procrustes Analysis (GPA), landmark data were analyzed using Principal Component Analysis (PCA), Canonical Variate Analysis (CVA) and Cluster Analysis by PAST software. The results showed significant differences among the studied populations in terms of the shape of the third epidermal plate ( $P < 0.001$ ). They were completely separated from each other. The shape of the third epimeral plate is a useful discriminating character for the identification of morphologically similar *Gammarus* species. According to the results of this study, it could be stated that the other examined populations attributed to *G. lordeganensis* in this study are not belong to this species, and there are clearly different *Gammarus* species.

**Keywords:** *Gammarus lordeganensis*, geometry morphometry, third epimeral plate