

بررسی تنوع ژنتیکی و DNA بار کدینگ دو گونه ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) و حلوا سیاه (*Parastromateus niger*) در خلیج فارس

چکیده

این پژوهش باهدف درک بهتر از الگوهای پراکندگی والدین، لاروها و همچنین کسب سوابق بارکد برای گونه‌های ماهیان سوکلا و حلوا سیاه با توجه به گونه‌های گزارش شده از سراسر جهان انجام گرفت. نمونه‌برداری از دو منطقه بندر ماهشهر در دو استان خوزستان و بندرعباس در استان هرمزگان و با توجه به نقاط صید عمده گونه‌های مزبور در سال ۱۳۹۹ انجام گردید. استخراج DNA با روش فنل - کلروفرم از باله‌های شنا با موفقیت کامل انجام شد و قسمتی از ژنوم mtDNA به نام ژن سیتوکروم اکسیداز زیر واحد یک (COI) با استفاده از یک جفت آغازگر و دمای اتصال (Annealing) ۵۴ درجه با موفقیت تکثیر و تعیین توالی گردید و در نهایت ۵۶۰ جفت باز قابل اطمینان جهت بررسی فایلوژنی انتخاب شدند. در این پژوهش، گونه سوکلا به همراه حلوا سیاه (با اختلاف ژنتیکی ۰/۲۲ بین این دو گونه) در دوشاخه مجزا قرار گرفتند که استفاده از گونه میش ماهیان به‌عنوان برون گونه (Out Group) با اختلاف ژنتیکی ۰/۲۵ درصدی بین این گونه و دو گونه یادشده دور از انتظار نبود. در ارتباط با گونه حلوا سیاه مشاهده می‌شود که این گونه از لحاظ تفاوت ژنتیکی بررسی شده اختلاف چندانی با نمونه‌های گزارش شده از هند و مالزی ندارد. عدم تنوع را می‌توان در گونه ماهی سوکلا مشاهده کرد که با توجه به مهاجر بودن این گونه انتظار می‌رفت که بتواند تنوع هاپلوتایپی قابل ملاحظه‌ای را ایجاد نماید. اگرچه شناسایی و وجود یک هاپلوتیپ مجزا از این گونه با اختلاف ژنتیکی یک‌درصدی با نمونه‌های هند، آمریکا و عربستان سعودی قابل کامل می‌باشد.

واژگان کلیدی: ماهی سوکلا، ماهی حلوا سیاه، خلیج فارس، بار کدینگ.

رضا نهانندی^{۱*}

سعید تمدنی جهرمی^۲

فروغ بیاتی^۳

۱ و ۳. موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۲. پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.

*مسئول مکاتبات:

Rezanahavandi91@gmail.com

کد مقاله: ۱۴۰۰۳۰۸۹۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۵

این مقاله پژوهشی و برگرفته از طرح

پژوهشی است.

مقدمه

ماهیان، بزرگ‌ترین گروه مهره‌داران هستند که تنوع وسیعی در ویژگی‌ها و سازگاری‌های زیستی از خود نشان می‌دهند. گونه‌های ماهیان بر اساس وجود خصوصیات ریختی تشخیصی از سایر گونه‌ها متمایز می‌شوند، اما تعداد زیاد ویژگی‌های درون‌گونه‌ای یا همپوشانی‌های ریخت‌شناسی بین‌گونه‌ای در بین ماهیان وجود دارد که چالشی مهم پیش روی تاکسونومیست‌ها برای شناسایی دقیق ماهیان آن‌ها است. به عبارت دیگر، گروه‌های متنوعی از نقطه‌نظر مرفولوژی در بین مهره‌داران هستند و نیز دارای تنوع فنوتیپی متغیر طی مراحل مختلف رشد هستند، لذا شناسایی تمام گونه‌های ماهیان از طریق اکتفا نمودن به صفات مرفولوژیک امکان‌پذیر نیست (Omair et al., 2020). قطعاتی از DNA میتوکندری، مانند سیتوکروم c اکسیداز (COI)، I، سیتوکروم b (CYTB) و RNA ریبوزومی نشانگرهای مولکولی هستند که معمولاً برای شناسایی گونه‌ها و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک در ماهیان استفاده می‌شوند (Damerou et al., 2018).

خانواده *Rachycentridae* یکی از قدیمی‌ترین و ابتدایی‌ترین ماهیان استخوانی است که تنها دارای یک گونه بنام سوکلا (*Rachycentron canadum*) می‌باشد. ماهی سوکلا که سطح زی و دارای رشد سریعی است، ساکن منطقه گرمسیری و نیمه گرمسیری و آب‌های گرم معتدله، به‌غیر از شرق اقیانوس آرام و دریای مدیترانه می‌باشد. این ماهی در غرب اقیانوس اطلس از ایالت ماساچوست تا آرژانتین، در شرق اقیانوس اطلس از جنوب موروکو تا جنوب آفریقا، در غرب اقیانوس آرام از ژاپن تا استرالیا دیده می‌شود و بیشترین فراوانی را در خلیج مکزیک دارد. فراوانی این گونه در فصول مختلف متفاوت است و در زمستان، فراوانی بیشتری در مناطق گرمسیری دارد رابطه بین فیزیولوژی ماهی و محیط یکی از راه‌های درک اثرات تغییرات آب‌وهوا بر روی ماهی است. یک مطالعه فیزیولوژیک در سال‌های اخیر نشان داد که ماهی سوکلا (کوبیا) قادر به مقاومت در برابر دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد است. باین‌حال، هنگامی که در این شرایط تا حد خستگی ورزش می‌رسند، ۳۰ درصد از افراد دچار مرگ‌ومیر شدند (Crear et al., 2020). علاوه بر این، این مطالعه نشان داد که کوبیا تحمل هیپوکسی بسیار بالایی دارد که در آن افراد می‌توانند سطوح اکسیژن کمتر از $1/7 - 2/4$ میلی‌گرم در لیتر را در دمای بین ۲۴ تا ۳۲ درجه سانتی‌گراد تحمل کنند (Crear et al., 2020). این ماهی در ایران در سراسر دریای عمان و بخش شرقی خلیج فارس تا بوشهر پراکنش دارد (سالاری علی‌آبادی و همکاران، ۱۳۸۷). ماهی سوکلا دارای پروتئین باارزش بالا می‌باشد و به خاطر کیفیت بسیار خوب گوشت، یکی از بهترین گونه‌ها جهت آبی‌پروری محسوب می‌گردد. امروزه جمعیت ماهی سوکلا در اکثر اکوسیستم‌های جهان و از جمله خلیج فارس و دریای عمان به علت صید غیرمجاز به شدت کاهش یافته است و ذخایر باقی‌مانده نیز به دلیل تخریب بسترهای تخم‌ریزی و فشار صید بی‌رویه، صید غیرقانونی و آلودگی، با مشکلاتی مواجه می‌باشد، لذا تکثیر طبیعی این ماهی از جمله در حوضه شمالی خلیج فارس و دریای عمان به حداقل رسیده است. گسترش برنامه‌های مدیریتی و انجام فعالیت‌های بازسازی ذخایر ماهی سوکلا هنگامی می‌تواند مفید باشد که تنوع ژنتیکی ساختار جمعیت این گونه درک شود، زیرا این اطلاعات در انتخاب جمعیت‌های دهنده ژن در تکثیر مصنوعی از لحاظ تعیین ساختار جمعیت و نیز بازسازی ذخایر، ضروری به نظر می‌رسد (طالا و همکاران، ۱۳۹۴).

ماهی حلوا سیاه بانام علمی *Parastromateus niger* از خانواده *Carangidae* می‌باشد. این گونه ماهی جز مهم‌ترین ماهیان پلاژیک تجاری سواحل جنوبی ایران است که در بازارهای داخلی و جهانی از اهمیت زیادی برخوردار است. این ماهی، پلاژیک - نریتیک ساحلی می‌باشد و اغلب با تورهای گوش‌گیر و ترال کف صید می‌گردد. در منطقه فلات قاره یافت شده و معمولاً بر روی بسترهای گلی در اعماق ۱۵ تا ۴۰ متر دیده می‌شوند. ژئوپلانکتون‌خوار بوده و روزها در نزدیک بستر و در هنگام شب به سطح آب نزدیک می‌شود (Froese et al., 2020). این ماهی دارای شنای کند است و معمولاً به صورت گله‌ای (Schooling) یافت می‌شود (Anam and Mostarda, 2012) در طول سواحل سراسر فلات قاره هند و غرب اقیانوس آرام، در سراسر خلیج فارس و سواحل شرقی آفریقای جنوبی و میان اندونزی، استرالیا و سواحل جنوبی ژاپن و چین و در سراسر خلیج فارس و دریای عمان، دریا‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری پراکنده است. بیشترین میزان صید ماهی حلوا سیاه در سواحل ایرانی خلیج فارس طی ماه‌های اسفند و فروردین صورت می‌گیرد.

زیر واحد یک از ژن سیتوکروم اکسیداز DNA میتوکندریایی به‌عنوان یک بارکد در تشخیص گونه‌ای بسیاری از ماهیان، از جمله ماهیان دریایی استرالیایی، ماهیان آب شیرین کانادا و ماهیان زینتی آمریکای شمالی مؤثر و کارا بوده است (Bhattacharya et al., 2016). هوبرت و همکاران (۲۰۱۵) استفاده از این ژن را به‌عنوان یک سامانه تشخیص زیستی جانوری معرفی کردند. تشخیص دقیق و بدون ابهام ماهیان و محصولات آن‌ها، از تخم تا ماهی بالغ به مدیریت پایدار ذخایر شیلاتی و بهبود حفاظت از بوم‌سازگان کمک خواهد کرد. لذا تکنیک بارکدگذاری DNA می‌تواند در تشخیص دقیق گونه‌های ماهیان مؤثر باشد. کمپین بین‌المللی بارکدگذاری ماهی متعلق به کنسرسیوم بین‌المللی بارکد DNA، برای شناسایی گونه‌ها (International Barcode of life: IBOL)، پایگاه داده استانداردشده‌ای عنوان مرجع توالی همه ماهیان ایجاد کرده است. در تاکسونومی، DNA بارکدینگ برای شناسایی مرسوم نمونه‌ها به کار می‌رود، درحالی که در مطالعات فیلوژنتیک، DNA بارکدینگ به‌عنوان نقطه آغاز برای انتخاب بهینه تاکسون به کار می‌رود و توالی بارکدها (خط شناسه‌ها) به پایگاه داده‌ها جهت تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی اضافه می‌شود

(Abbasi et al., 2017). سپس اطلاعات در یک پایگاه داده جهت ارزیابی فاصله ژنتیکی درون و بین گونه‌ای تجزیه و تحلیل می‌گردد. خط شناسه ژنتیکی به‌عنوان یک ابزار فوق‌العاده ارزشمند در دست سازمان‌های نظارتی و مدیران شیلاتی امکان احراز هویت گونه‌ای، حفظ سلامت مصرف‌کننده، تاکسونومی (Karahan et al., 2017; Hubert and Hanner, 2015)، کنترل ایمنی مواد غذایی و مدیریت حفاظت از محیط‌زیست عمل نماید (Kress et al., 2015).

یکی دیگر از کاربردهای مهم خط شناسه ژنتیکی، شناسایی اکتیوپلانکتون‌ها (Hubert and Honner, 2015) و بازاریابی شیلاتی است (Smriti et al., 2017). همچنین عدم تأثیرپذیری از محیط، سرعت انجام، هزینه به نسبت پایین و استفاده از یک شاخص در مقابل رده‌بندی چند متغیره از دیگر دلایل استفاده از این روش است (Bingpeng et al., 2018). این در حالی است که بیش از ۱۰۰ موشه از بیش از ۴۰ کشور عضو رسمی کنسرسیوم جهانی بارکدینگ بوده و در قالب سه گروه به فعالیت در زمینه شناسایی تنوع زیستی مشغول هستند که ایران به همراه کشورهای پاکستان، پرو، کاستاریا، کنیا، کره، ماداگاسکار و گینه‌نو به‌عنوان National mode مأموریت جمع‌آوری، شناسایی و ارزیابی گونه‌های جانوری از کشور خود را دارند (Delrieu-Trottin et al., 2019). در میان نشانگرهای مولکولی، ژن سیتوکروم اکسیداز میتوکندریایی، یکی از معتبرترین نشانگرها برای تفکیک گونه‌ها از یکدیگر می‌باشد. با استفاده از تکنیک توالی‌یابی ژن (Sequencing) می‌توان پلی مورفیسم را در افراد بسیار شبیه به هم آشکار کرد و تا حدی از آن در سطح بین‌گونه‌ای استفاده می‌شود. نشانگر ژنتیکی (Cytochrome Oxidase, subunit I=COI) که برای تهیه توالی‌هایی از DNA تکثیر می‌گردد که این ناحیه از ژن میتوکندری که کد کننده پروتئین است، بسیار حفاظت‌شده است (Abdullah and Rehbein, 2017; Alcantara and Yambot, 2016).

لذا جهت شناسایی و فهرست کردن گونه‌های آبزیان ارزشمند و در معرض خطر کشور (IUCN, 2019)، استفاده از بارکد گذاری DNA یا خط شناسه ژنتیکی جهت ایجاد کتابخانه‌ای به‌عنوان مرجع ژنتیکی آبزیان، یک ضرورت اساسی به نظر می‌رسد (Henrique et al., 2015). با توجه به عدم وجود اطلاعات ژنتیکی کافی و بارکدینگ ماهیان ارزشمند و اقتصادی بومی کشور از جمله ماهیان سوکلا و حلوا سیاه این تحقیق می‌تواند در رفع ابهامات موجود در این زمینه مؤثر باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری‌ها از مناطق هدف و موردنظر (بندرعباس و بندر ماهشهر) که اصلی‌ترین و مهم‌ترین زیستگاه‌های منحصربه‌فرد دو گونه مورد مطالعه در این مطالعه در ایران می‌باشد، در سال ۱۳۹۸ انجام گرفت. از هر نمونه، طبق روش استاندارد، حداقل ده قطعه از باله شای گونه‌های مورد مطالعه (Zhang and Hanne, 2011) جهت انجام کار مولکولی بر روی ژن مشترک سیتوکروم اکسیداز زیر واحد یک باهدف تشخیص دقیق گونه‌ها و تهیه خط شناسه ژنتیکی منحصربه‌فرد هر گونه، برداشته شد. سپس در الکل ۹۶ درصد تثبیت گردید و در نهایت جهت انجام آزمایش‌های مولکولی، به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان (بندرعباس) منتقل شدند.

استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم از باله شای گونه‌های مورد مطالعه با موفقیت کامل انجام شد. برای استخراج ژنوم کل (Total DNA) روش‌های گوناگون وجود دارد که در این تحقیق از روش فنل-کلروفرم به‌منظور شکستن سلول‌ها و جدا نمودن پروتئین‌ها و هیدرات‌های کربن از اسیدهای نوکلئیک و در نهایت رسوب دادن DNA از بافت‌ها با اتانول مطلق استفاده گردید (Taggart et al., 1990).



شکل ۱: نقشه محل صید دو گونه ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) و حلوا سیاه (*Parastromateus niger*) مورد نظر.

کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب با دو روش استفاده از ژل آگارز یک درصد و مشاهده با اشعه ماوراءبنفش و دستگاه اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی دقیق قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از ترکیبی حدود ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده در یک واکنش به میزان ۲۵ ماکرو لیتر حاوی ۶ ماکرو لیتر از آغازگرهای پیشرو و معکوس FISH1R: و FISH1F: 5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3' و 5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3' میلی مولار ۱۰ dNTP، ۲۵ میلی مولار $MgCl_2$ و نیز آنزیم تگ DNA پلیمرز (Taq DNA Polymerase) استفاده شد. جهت بهینه‌سازی شرایط واکنش، در مرحله اول با دادن دامنه حرارتی، بهترین دمای اتصال (Temperature Annealing) هر کدام از آغازگرها به رشته الگو به دست آمد و در مرحله بعد به منظور اخذ بهترین و شفاف‌ترین باندها و حذف باندهای ناخواسته، اقدام به بهینه کردن محصول PCR از طریق تغییر غلظت‌های $MgCl_2$ ، DNA، ژنومی و dNTP گردید. سیکل حرارتی استفاده شده شامل سیکل اولیه واسرشته سازی (Initial Denaturation) با برنامه ۹۴ درجه به مدت ۴ دقیقه و ۳۰ ثانیه و به دنبال آن ۴۰ سیکل شامل ۹۴ درجه واسرشته سازی (Denaturation) به مدت ۳۰ ثانیه و نیز دمای اتصال یا الحاق آغازگر در کنار DNA (Annealing) ۵۴ درجه به مدت یک دقیقه و مرحله بسط (Extension) ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و در نهایت دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود.

در این پژوهش، ۵۶۰ جفت باز قابل اطمینان از قسمتی از ژنوم mtDNA بنام COI و با استفاده از آغازگرهای مشترک بین گونه‌ای که در مطالعات مختلف جهت بارکدینگ گونه‌های مختلف استفاده می‌شود، با موفقیت توالی یابی و جهت بررسی فیلوژنی انتخاب شدند. واکنش‌های توالی یابی DNA به همراه آغازگر پیشرو با استفاده از Applied Biosystems Foster City, XL3730، مدل DNA analyzer انجام گردید. پس از توالی یابی با استفاده از نرم‌افزار BioEdit و ابزار قدرتمند BLAST و رویه BLAST در پایگاه NCBI میزان همولوژی توالی‌های به دست آمده سنجیده شد. پس از دریافت توالی‌ها، بازنگری توالی‌های مشابه با نرم‌افزار Chromas-23.2 انجام شد. به منظور شناسایی اختلاف میان توالی‌ها، نمونه‌های توالی یابی شده با نرم‌افزار Clustal W با استفاده از نرم‌افزار Bio Edit هم‌ردیف شدند (Thompson, 1994). درخت تکاملی به روش‌های پارسیمونی (Maximum Parsimony) و نیز نزدیک‌ترین هم‌جواری (Neighbor-Joining) بر اساس مدل

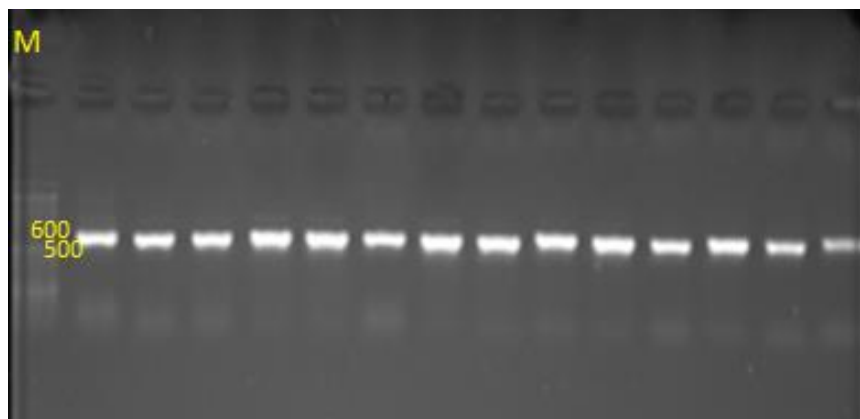
Kimura 2-parameter با در نظر گرفتن میزان Bootstap با هزار بار تکرار با استفاده از نرم‌افزار ۶ MEGA رسم گردید (Kimura, 1980).

نتایج

DNA های استخراج‌شده از باله‌های شنای دو گونه مورد مطالعه به‌روش فنل-کلروفرم کیفیت مناسبی جهت استفاده برای انجام PCR داشتند. وجود باندهای شفاف، نشان‌دهنده آن است که DNA استخراجی فاقد آلودگی پروتئینی، فنلی و یا آلودگی به RNA است. توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه داده‌های بانک ژن توسط جستجوی بلاست (Blast) انطباق داده شدند. عملیات بیوانفورماتیک و تجزیه و تحلیل بارکد هر توالی در نرم‌افزار کنسرسیوم خط شناسه گذاری (Consortium for the Barcode of life: CBOL) و پایگاه داده‌های بانک جهانی ژن (National Center for Biotechnology Information: NCBI)، طبقه‌بندی فیلوژنتیک و میزان تشابه هر نمونه مشخص گردید. این توالی‌ها با کدهای دسترسی به شرح زیر در بانک جهانی ژن ثبت شدند.

جدول ۱: کدهای دسترسی دو گونه ماهی مورد مطالعه در بانک جهانی ژن (NCBI).

ردیف	نام ماهی (به فارسی)	نام ماهی (به انگلیسی)	نام ژن	بانک جهانی ژن	کد دسترسی
۱	حلو سیاه	<i>Parastromateus niger</i>	COI زیر واحد یک	NCBI	MZ203139
۲	سوکلا	<i>Rachycentron canadum</i>	COI زیر واحد یک	NCBI	MZ191795



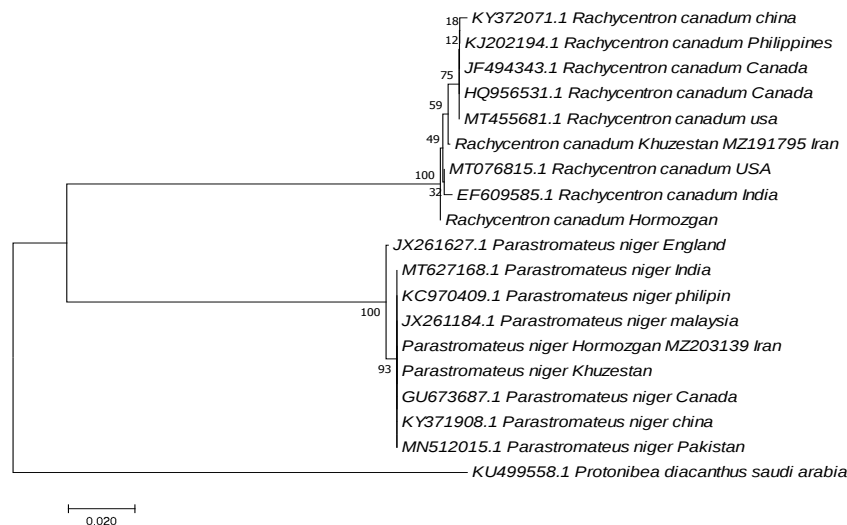
شکل ۲: محصول PCR دو گونه ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) و حلو سیاه (*Parastromateus niger*) (سال ۱۳۹۹).

ریخت‌شناسی حاصل از ترسیم درخت تکاملی Neighbor-Joining به‌روش فاصله Kimura 2-parameter بسیار عمیق است که وجود دو شاخه اصلی را نشان می‌دهد که نمونه‌های گونه سوکلا با اختلاف ژنتیکی ۰/۲۴ درصدی بین این گونه و گونه حلو سیاه در دو شاخه مجزا قرار گرفتند. در ارتباط با گونه حلو سیاه مشاهده می‌شود که این گونه از لحاظ تفاوت ژنتیکی بررسی‌شده، اختلاف چندانی با نمونه‌های گزارش‌شده از

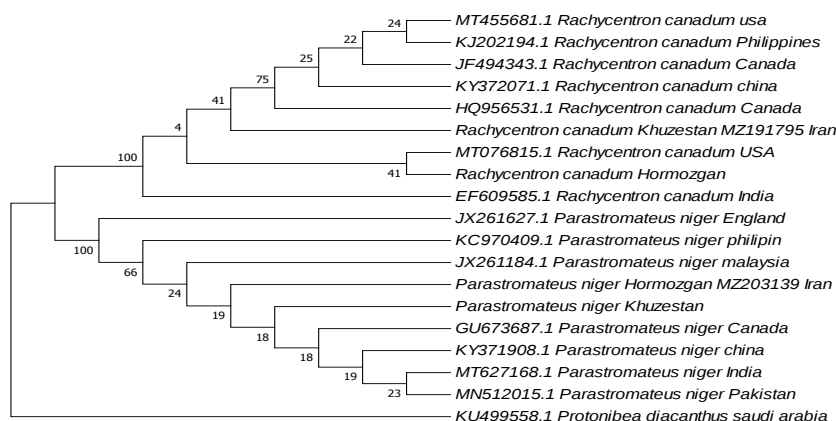
هند و مالزی ندارد. نکته قابل توجه در این زمینه، شناسایی یک هاپلوتایپ جدید از گونه سوکلا در منطقه خلیج فارس می باشد که در شاخه اول به صورت مجزا با اختلاف ژنتیکی از دیگر نمونه های ثبت شده مانند هند، آمریکا، عربستان سعودی و چین در بانک جهانی ژن متمایز گردیده است.

جدول ۲: در صد فاصله ژنتیکی توالی های ژن COI دو گونه ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) و حلوا سیاه (*Parastromateus niger*) در منطقه خلیج فارس در مقایسه با نمونه های گزارش شده از مناطق دیگر.

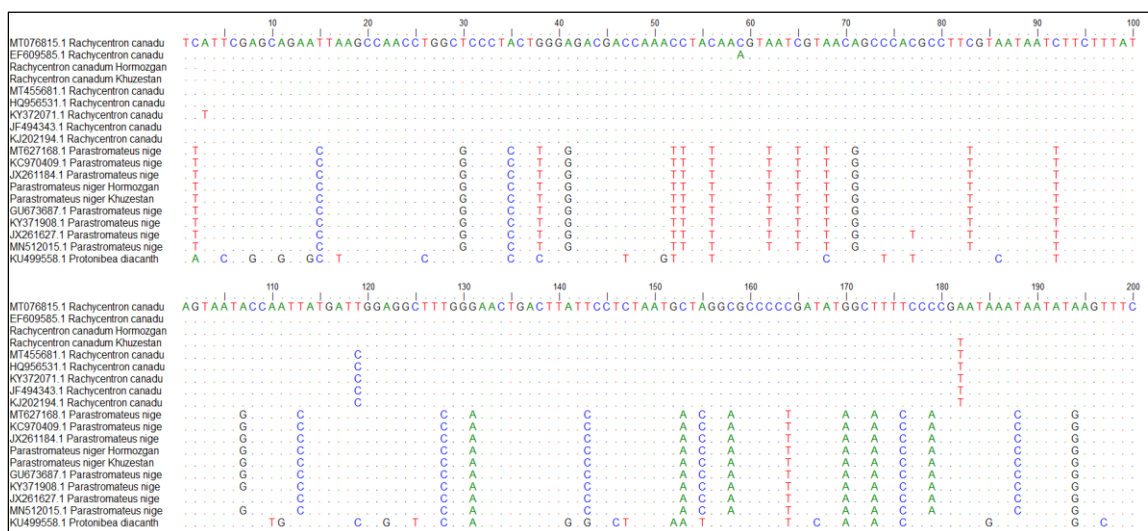
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. MT076815.1 <i>Rachycentron canadum</i> USA																			
2. EF609585.1 <i>Rachycentron canadum</i> India	0.00																		
3. <i>Rachycentron canadum</i> Hormozgan	0.00	0.00																	
4. <i>Rachycentron canadum</i> Khuzestan MZ191795 Iran	0.00	0.00	0.00																
5. MT455681.1 <i>Rachycentron canadum</i> usa	0.01	0.01	0.01	0.00															
6. HQ956531.1 <i>Rachycentron canadum</i> Canada	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00														
7. KY372071.1 <i>Rachycentron canadum</i> china	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00													
8. JF494343.1 <i>Rachycentron canadum</i> Canada	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00												
9. KJ202194.1 <i>Rachycentron canadum</i> Philippines	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00											
10. MT627168.1 <i>Parastromateus niger</i> India	0.21	0.22	0.21	0.21	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22										
11. KC970409.1 <i>Parastromateus niger</i> philipin	0.21	0.22	0.21	0.21	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.00									
12. JX261184.1 <i>Parastromateus niger</i> malaysia	0.21	0.22	0.21	0.21	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.00	0.00								
13. <i>Parastromateus niger</i> Hormozgan MZ203139 Iran	0.21	0.22	0.21	0.21	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.00	0.00	0.00							
14. <i>Parastromateus niger</i> Khuzestan	0.21	0.22	0.21	0.21	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00						
15. GU673687.1 <i>Parastromateus niger</i> Canada	0.21	0.22	0.21	0.21	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00					
16. KY371908.1 <i>Parastromateus niger</i> china	0.21	0.22	0.21	0.21	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00				
17. JX261627.1 <i>Parastromateus niger</i> England	0.21	0.22	0.21	0.21	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
18. MN512015.1 <i>Parastromateus niger</i> Pakistan	0.21	0.22	0.21	0.21	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
19. KU499558.1 <i>Protonibea diacanthus</i> saudi arabia	0.27	0.27	0.27	0.27	0.26	0.26	0.27	0.26	0.26	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	



شکل ۳: درخت فیلوژنی ژن COI دو گونه ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) و حلوا سیاه (*Parastromateus niger*) در منطقه خلیج فارس در مقایسه با نمونه‌های گزارش شده از مناطق دیگر به روش Neighbor-Joining.



شکل ۴: درخت فیلوژنی ژن COI دو گونه ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) و حلوا سیاه (*Parastromateus niger*) در منطقه خلیج فارس در مقایسه با نمونه‌های گزارش شده از مناطق دیگر به روش Maximum Parsimony.



شکل ۵: هم‌ردیفی قسمتی از توالی‌های ژن COI دو گونه ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) و حلوا سیاه (*Parastromateus niger*) در منطقه خلیج فارس در مقایسه با نمونه‌های گزارش شده از مناطق دیگر.

بحث و نتیجه گیری

ژنوم میتوکندری به یک نشانگر مولکولی قدرتمند برای تجزیه و تحلیل ژنتیکی تبدیل شده است که می تواند مکان های اطلاعاتی ژنتیکی بیشتری را فراهم کند و دارای حفاظت بالا و ویژگی های ساختاری ساده است (li *et al.*, 2021). در این پژوهش، قسمتی از ژنوم mtDNA بانام ژن COI و با استفاده از آغازگرهای مشترک بین گونه ای که در مطالعات مختلف جهت بارکدینگ گونه های مختلف استفاده می شود، با موفقیت تکثیر و تعیین توالی گردید و حدود ۶۵۰ جفت باز تکثیر و با جداسازی بازهای انتهایی مشکوک، ۵۶۰ جفت باز قابل اطمینان جهت بررسی فایلوژنی انتخاب شدند که این توالی ها جهت ثبت در بانک جهانی ارائه شد. یکی از اهداف مهم بارکدینگ ژنی گونه های ارزشمند، حفاظت از آن گونه ها می باشد (Omir *et al.*, 2020). درخت فایلوژنی ژن COI دو گونه ماهی سوکلا و حلوا سیاه در منطقه خلیج فارس در مقایسه با نمونه های گزارش شده از مناطق دیگر به روش Neighbor-Joining و نیز روش Maximum Parsimony نشان داد که در این پژوهش، گونه سوکلا به همراه حلوا سیاه (با اختلاف ژنتیکی ۰/۲۲ بین این دو گونه) در دو شاخه مجزا قرار گرفتند که استفاده از گونه میش ماهیان به عنوان برون گونه (Out Group) با اختلاف ژنتیکی ۰/۲۵ درصدی بین این گونه و دو گونه یادشده دور از انتظار نبود (شکل ۳). در ارتباط با گونه حلوا سیاه مشاهده می شود که این گونه از لحاظ تفاوت ژنتیکی بررسی شده اختلاف چندانی با نمونه های گزارش شده از هند و مالزی ندارد که این امر بیانگر آن است که مهاجرت این گونه به سایر نقاط دنیا نتوانسته است تنوع هاپلوتایپی خاصی را ایجاد کند که این امر می تواند به علت صید بی رویه و نیز از دست دادن زیست گاه های این گونه بوده است که منجر به کاهش آلل ها و به تبع آن کاهش تنوع ژنتیکی می شود (Sheraliev *et al.*, 2021). همچنین این عدم تنوع را می توان در گونه سوکلا مشاهده کرد که با توجه به مهاجر بودن این گونه انتظار می رفت که بتواند تنوع هاپلوتایپی قابل ملاحظه ای را ایجاد نماید، ولی با توجه به اینکه در حال حاضر صید این گونه در آب های ایران بسیار پایین آمده است، احتمال از دست دادن آلل ها بسیار بالا است. از طرف دیگر مرکزی در جزیره قشم اقدام به واردات ماهیان انگشت قد جهت تکثیر این گونه نموده است که با توجه به استفاده بیش از حد از مولدین و افزایش میزان هم خونی در بین جمعیت های پرورشی و ورود احتمالی آن ها به دریا می توان انتظار داشت که در آینده نزدیک تنوع ژنتیکی این گونه پایین تر آمده و این گونه دستخوش صدمات جدی در زمینه کاهش رشد و باز ماندگی گردد. این گونه جزو گونه های درجه یک محسوب شده و قاعدتاً صید بالایی در مورد این گونه اعمال می گردد. گرچه شناسایی و وجود یک هاپلوتیپ مجزا از این گونه با اختلاف ژنتیکی یک درصدی با نمونه های هند، آمریکا و عربستان سعودی قابل کامل می باشد که نشان دهنده ایجاد تنوع هاپلوتیپی متوسط این گونه در خلیج فارس می باشد که به طور قطع نمونه برداری در آینده با تعداد نمونه های بیشتر می تواند مؤید این نظریه باشد (جدول ۲). در این حال، تراز تنوع هاپلوتیپی می تواند از صفر (تمام افراد جمعیت دارای هاپلوتیپ یکسان) تا یک (تمام افراد جمعیت دارای هاپلوتیپ های متفاوت) متغیر باشد. به طور کلی، میزان تنوع هاپلوتیپی متوسط تا بالا برای گونه های دریایی غیر معمول نیست (Zardoya *et al.*, 2004; Peijnenburg *et al.*, 2004). این تنوع بالا، اغلب به بزرگ بودن اندازه جمعیت و پراکندگی گسترده در فواصل زیاد در گونه های دریایی نسبت داده می شود که منجر به نگهداری بسیاری از هاپلوتیپ های منحصر به فرد در طول رشد و پراکنش جمعیت می گردد (Bingpeng, 2017). البته اندازه جمعیت ممکن است در مناطق مختلف جغرافیایی به دلیل کاهش یا افزایش جمعیت ناشی از عوامل کاهنده مانند مرگ و میر و افزایش ورود نوپاها و رشد فردی، به طور مرتب در حال تغییر بوده و در نتیجه سطوح تنوع ژنتیکی نیز، دستخوش تغییراتی گردد (Shen *et al.*, 2016). علاوه بر این، پویایی تکاملی (جهش، رانش ژنتیکی، انتخاب طبیعی) که در سطوح مختلف بر موجود تأثیر گذار هستند نیز ممکن است باعث بروز الگوهای متفاوت تنوع ژنتیکی شوند (Chang *et al.*, 2017). یکی از مهم ترین عواملی که می تواند در تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت گونه های مختلف منطقه دخالت داشته باشد، وجود سدهای فیزیکی و یا گیاهی در مناطق مورد بررسی می باشد (Tiedeman *et al.*, 2000). وجود خوریات و جنگل های حرا در هر منطقه، تأثیر زیادی بر میزان تنوع ژنتیکی آبزیان دارد (Hubert *et al.*, 2019). جنگل های حرا، یکی از مهم ترین مناطق نوزادگاهی و تغذیه لارو میگو و ماهیان به حساب می آیند که باعث می شود بعضی از گونه ها نقاط خاص نوزادگاهی را به خود اختصاص داده و تمایل کمتری به مهاجرت داشته

باشند (Yang et al., 2021). در همین ارتباط این گونه از لحاظ تجاری در گرید A قرار می‌گیرد و به نسبت دیگر گونه‌های مورد بررسی از میزان صید بالایی برخوردار است که این امر نیز می‌تواند در این مطالعه مورد توجه قرار گیرد. البته در همین ارتباط می‌توان به این نکته اشاره کرد که بالین‌حال، بارکدگذاری DNA با تمام مزایای آن، محدودیت‌های زیادی دارد، از جمله این روش به یک کتابخانه DNA قابل اعتماد نیاز دارد تا توالی‌های تازه احیاشده با موجود مقایسه شود (Ali and Aly, 2020). اطلاع از جریان ژنی و تأثیر آن در بسیاری از تحقیقات از جمله ژنتیک جمعیت، اکولوژی جمعیت، بیولوژی حفاظت از گونه‌ها و غیره از اهمیت زیادی برخوردار است (Omir et al., 2020). مبادله ژن‌ها بین جمعیت‌ها، توالی‌های آلی رابین جمعیت‌ها یکنواخت نموده و اثرات به‌گزینی (Selection) و رانش ژنتیکی (Genetic drift) را مشخص می‌کند. جریان ژنی بالا مانع از سازگاری منطقه‌ای شده و بنابراین مانع از فرآیند گونه‌زایی می‌گردد (Balloux and Lugon-Moulin, 2002). در این تحقیق نیز می‌توان به این نکته اشاره کرد که با توجه به حضور گونه‌های مهاجر مانند سوکلا در منطقه خلیج فارس، شاهد ایجاد جریان ژنی و افزایش تنوع ژنتیکی بین این گونه و نمونه‌هایی از هند، عربستان سعودی و آمریکا هستیم. اگرچه همان‌طور که عنوان گردید نمونه خوزستان، خود را از بقیه نمونه‌ها با یک هاپلوتایپ جدا نشان می‌دهد. درنهایت می‌توان به این نکته اشاره نمود که نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در بررسی‌های ژنتیکی، بارکدینگ و تهیه ژن بانک‌ها، گاه مواردی که می‌توان متمایزکننده مورفوتایپ‌های جدید باشد، مهم بوده و انجام چنین بررسی‌هایی به‌عنوان یک ابزار مهم برای انتخاب مولدین در برنامه‌های اصلاحی و همچنین بازسازی ذخایر بنیادی و اساسی محسوب می‌گردد.

سپاسگزاری

از ریاست محترم پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان جناب آقای دکتر مرتضوی، معاون محترم پژوهشی پژوهشکده سرکار خانم دکتر محبی نوذر و تمامی همکاران و بزرگوارانی که ما را در انجام هرچه بهتر این تحقیق یاری نمودند، صمیمانه قدردانی و سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

سالاری علی‌آبادی، م. ع.، رضوانی گیل کلانی، س.، سواری، ا.، ذوالقرنین، ح. و نبوی، س. م. ب.، ۱۳۸۷. مقایسه ژنتیکی جمعیت‌های ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از روش میکروستالیت. مجله شیلات. ۲ (۱): صفحات ۹-۱.

طلا، م.، آزاد، م.، لالویی، ف.، تمدنی جهرمی، س. و تقوی، م. ج. ف.، ۱۳۹۴. بررسی ماهی سوکلا *Rachycentron canadum* در آب‌های شمالی خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از ژن ND2)2 NADH dehydrogenase subunit. مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی-مولکولی. ۶ (۲۱): صفحات ۵۷-۴۹.

Ali, F. S., Ismail, M. and Aly, W., 2020. DNA barcoding to characterize biodiversity of freshwater fishes of Egypt. Molecular Biology Report, 47: 5865–5877.

Anam, R. and Mostarda, E., 2012. Field identification guide to the living marine resources of Kenya, FAO fish finder, Roma, Great Roma, P: 197.

Abbas, E. M., Soliman, T., El-Maghd, M. A., Farrag, M. M. S., Ismail, R. F. and Kato, M., 2017. Phylogeny and DNA barcoding of the family Sparidae inferred from mitochondrial DNA of the Egyptian waters. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 12: 73–81.

Abdullah, A. and Rehbein, H., 2017. DNA barcoding for the species identification of commercially important fishery products in Indonesian markets. Interernational Journal of Food Science Technology, 52 266-274.

Alcantara, S. G. and Yambot, A. V., 2016. DNA barcoding of commercially important Grouper species (Perciformes, Serranidae) in the Philippines. Mitochondrial DNA Part A 27:3837_3845 DOI 10.3109/19401736.2014.958672.

- Bakar, A. A., Adamson, E. A. S., Juliana, L. H., Nor Mohd, S. A., Wei-Jen, C. and Man, A., 2018.** DNA barcoding of Malaysian commercial snapper reveals an unrecognized species of the yellow-lined *Lutjanus* (Pisces: Lutjanidae). PLOS ONE 13:e0202945. DOI 10.1371/journal.pone.0202945.
- Balloux, F. and Lugon-Moulin, N., 2002.** The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology, 11: 155–165.
- Bingpeng, Z. Z. L. R. X., 2017.** Suitability analysis of mitochondrial COI gene used as DNA barcode for Ophichthyidae. Applied Oceanography. 36(3): 5.
- Bhattacharya, M., Sharma, A. R., Patra, B. C., Sharma, G., Seo, E. M., Nam, J. S., Chakraborty, C. and Lee, S. S., 2016.** DNA barcoding to fishes: current status and future directions Mitochondrial DNA Part A. 27: 2744_2752. DOI 10.3109/19401736.2015.1046175.
- Chang, C. H., Shao, K. T., Lin, H. Y., Chiu, Y. C., Lee, M. Y. and Liu, S. H., 2017.** DNA barcodes of the native ray-finned fishes in Taiwan. Molecular ecology resources. 17(4): 796±805. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12601> PMID: 27717215.
- Delrieu-Trottin, E., Williams, J. T., Pitassy, D., Driskell, A., Hubert, N., Viviani, J., Cribb, T. H., Espiau, B., Galzin, R., Kulbicki, M., Lisonde, L. T., Meyer, C., Mourier, J., Mou-Tha, G., Parravicini, V., Plantard, P., Sasal, P., Siu, G., Tolou, N., Veuille, M., Weigt, L. and Planes, S., 2019.** A DNA barcode reference library of French Polynesian shore fishes. Scientific Data 6:114 DOI 10.1038/s41597-019-0123-5.
- Henriques, J. M., Silva, G. J. C., Ashikaga, F. Y., Hanner, R., Foresti, F. and Oliveira, C., 2015.** Use of DNA barcode in the identification of fish species from Ribeira de Iguape Basin and coastal rivers from São Paulo State (Brazil). DNA Barcodes 3: 118–128.
- Hubert, N., Lumbantobing, D., Sholihah, A., Dahrudin, H., Delrieu-Trottin, E., Busson, F., Sauri, S., Hadiaty, R. and Keith, P., 2019.** Revisiting Species Boundaries and Distribution Ranges of *Nemacheilus* spp. (Cypriniformes: Nemacheilidae) and *Rasbora* spp. (Cypriniformes: Cyprinidae) in Java, Bali and Lombok through DNA Barcodes: Implications for Conservation in a Biodiversity Hotspot. Conserv. Genet, 20: 517–529.
- Hubert, N., Espiau, B. and Meyer, C., 2015.** Identifying the ichthyoplankton of a coral reef using DNA barcodes. Molecular Ecology Resources, 15(1): 57–67.
- Hubert, N. and Hanner, R., 2015.** DNA barcoding, species delineation and taxonomy: a historical perspective. DNA Barcodes, 3:44-58.
- IUCN., 2019.** The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-1. (Accessed on 21 March 2019).
- Karahan, A., Douek, J., Paz, G., Stern, N., Kideys, A. E. and Shaish L., 2017.** Employing DNA barcoding as taxonomy and conservation tools for fish species censuses at the southeastern Mediterranean, a hot-spot area for biological invasion. Journal for Nature Conservation. 36: 1±9. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2017.01.004> PubMed PMID: WOS: 000400593400001.
- Kimura, M., 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16(2): 111–120.
- Kress, W. J. Garcia-Robledo, C. Uriarte, M. and Erickson D. L. 2015.** DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. Trends in ecology & evolution. 30(1): 25±35. Epub 2014/12/04. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.10.008> PMID: 25468359.
- Milligan, B. G. 1998.** Total DNA isolation. In: Hoelzel AR, editor. Molecular Genetic Analysis of Population: A Practical Approach, 2nd Edition. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 29–64.
- Omir, A., Asmaa, G. K., Samy, Abd. E. L. S., Alaa, G. M. O. and Khaled M. G., 2020.** A case study for application of DNA barcoding in identifying species and genetic diversity of fish from the Suez city market, Egypt. Aquatic Living Resources, 33: 11. DOI: 10.1051/alr/2020012.
- Peijnenburg, K. T. C., Breeuwer, J. A. J., Pierrot-Bults, A. C. and Menken, S. B. J., 2004.** Phylogeography of the planktonic chaetogenath *Sagitta setosa* reveals isolation in European seas. Evolution, 58: 1472-1487.
- Rozas, J. et al., 2003.** DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics, 19: 2496–2497.

- Shen, Y. J., Guan, L. H., Wang, D. Q. and Gan, X. N., 2016.** DNA barcoding and evaluation of genetic diversity in Cyprinidae fish in the midstream of the Yangtze River. *Ecology and evolution*, 6(9): 2702-2713.
- Sheraliev, B., Allayarov, S. and Peng, Z., 2021.** DNA barcoding revealed a wider distribution of *Alburnoides holciki* (Teleostei: Leuciscidae) in the inland waters of Uzbekistan. *Journal of Applied Ichthyology*. <https://doi.org/10.1111/jai.14206>.
- Smriti, S., Islam, T., Begum, M. K., Punom, N. J., Mitra, S. and Hossain, A., 2017.** Fraudulence Detection in Fish Marketing of Bangladesh using DNA Barcoding. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*, 41(1): 17-27.
- Taggart, J. B., McNally, S. F. and Sharp, P. M., 1990.** Genetic variability and differentiation among founder population of the pitcher plant (*Sarracenia purpurea* L.) in Ireland. *Heredity* 64: 177-183.
- Taggart, J. B., Hynes, R. A., Prodohal, P. A. and Ferguson, A., 1990.** A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of fish biology*, 40: 963-965.
- Tiedemann, R., Hardy, O., Vekemans, X. and Milinkovitch, M. C., 2000.** Higher impact of female than male migration on population structure in large mammals. *Molecular Ecology*, 9: 1159-1163.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J., 1994.** *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- Zardoya, R., Castilho, R., Grande, C., Favre-Krey, L., Caetano, S., Marcato, S., Krey, G. and Patarnello, T., 2004.** Differential population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and the chub mackerel (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology*, 13: 1785-1798.
- Zhang, J. B., and Hanne, R., 2011.** DNA barcoding is a useful tool for the identification of marine fishes from Japan. *Biotechnology Systematics and Ecology*, 39 (1): 31-42.
- Crear, D. P., Brill, R. W., Averilla, L. M., Meakem, S. C. and Weng, K. C., 2020.** In the face of climate change and exhaustive exercise: the physiological response of an important recreational fish species. *Royal Society. Open Science*, 7: 1-13.
- Damerau, M., Freese, M. and Hanel, R., 2018.** Multi-gene phylogeny of jacks and pompanos (Carangidae), including placement of monotypic vadigo *Campogramma glaycos*. *Journal Fish Biology*, 92: 190-202.
- Li, B., Wang, H., Yang, L., Liu, S. and Zhuang, Z., 2021.** Complete Mitochondrial Genome of *Pseudocaranx dentex* (Carangidae, Perciformes) Provides Insight into Phylogenetic and Evolutionary Relationship among Carangidae Family. *Genes*, 12: 1234.
- Freese, R. and Pauly, D. eds., 2020.** Fish Base. World Wide Web electronic publication www.fishbase.org, version. (2020), accessed at www.fishbase.org in November/December 2020.

