بررسی تنوع ژنتیکی و DNA بارکدینگ دو گونه ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) و حلوا سیاه (*Parastromateus niger*) در خلیج‌فارس

رضا نهاوندی[1*]
سعید تمدنی جهرمی[2]
فروغ بیاتی[3]

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

***مسئول مکاتبات:**
Rezanahavandi91@gmail.com

کد مقاله: ۱۴۰۰۰۳۰۸۹۲
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۵
این مقاله پژوهشی و برگرفته از طرح پژوهشی است.

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 گزارش‌شده 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 (Anealing) ۵۴ درجه با موفقیت تکثیر و تعیین توالی گردید و درنهایت ۵۶۰ جفت باز قابل‌اطمینان 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 این‌گونه و دو گونه یادشده دور از انتظار نبود. در ارتباط با گونه حلوا سیاه مشاهده می‌شود که این‌گونه ازلحاظ تفاوت ژنتیکی بررسی‌شده اختلاف چندانی با نمونه‌های گزارش‌شده از هند و مالزی ندارد. عدم تنوع را می‌توان در گونه ماهی سوکلا مشاهده کرد که با توجه به مهاجر بودن این‌گونه انتظار می‌رفت که بتواند تنوع هاپلوتایپی قابل‌ملاحظه‌ای را ایجاد نماید. اگرچه شناسایی و وجود یک هاپلوتیپ مجزا ازاین‌گونه با اختلاف ژنتیکی یک‌درصدی با نمونه‌های هند، آمریکا و عربستان سعودی قابل کامل می‌باشد.

واژگان کلیدی: ماهی سوکلا، ماهی حلوا سیاه، خلیج‌فارس، بارکدینگ.

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. به‌عبارت‌دیگر، گروه های متنوعی ازنقطه‌نظر 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 (Omir *et al*., 2020). قطعاتی از DNA میتوکندری، مانند سیتوکروم c اکسیداز I (COI)، سیتوکروم b (CYTB) و RNA ریبوزومی نشانگرهای مولکولی هستند که معمولاً برای شناسایی گونه‌ها و تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیک در ماهیان استفاده می‌شوند (Damerau *et al*., 2018).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-07]

خانواده Rachycentridae یکی از قدیمی‌ترین و ابتدایی‌ترین ماهیان استخوانی است که تنها دارای یک‌گونه 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، به‌غیراز 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 افریقا، در غرب اقیانوس آرام از ژاپن تا استرالیا دیده می‌شود و بیشترین فراوانی را در خلیج مکزیک دارد. فراوانی این‌گونه 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. بااین‌حال، هنگامی‌که در این شرایط تا حد خستگی ورزش می‌رسیدند، 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 ۱/۷ – ۲/۴ 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 خلیج‌فارس 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 آبزی‌پروری محسوب می‌گردد. امروزه جمعیت ماهی سوکلا در اکثر اکوسیستم‌های جهان و ازجمله خلیج‌فارس و دریای عمان به علت صید غیرمجاز به‌شدت کاهش‌یافته 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 ازجمله در حوضه شمالی خلیج‌فارس 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 این‌گونه درک شود، زیرا این اطلاعات در انتخاب جمعیت‌های دهنده ژن در تکثیر مصنوعی ازلحاظ تعیین ساختار جمعیت و نیز بازسازی ذخایر، ضروری به نظر می‌رسد (طلا و همکاران، ۱۳۹۴).

ماهی حلوا سیاه بانام علمی *Parastromateus niger* از خانواده Carangidae می‌باشد. این‌گونه 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. زئوپلانکتون‌خوار 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 به‌صورت گله‌ای (Schooling) یافت می‌شود (Anam and Mostarda, 2012) در طول سواحل سراسر فلات قاره هند و غرب اقیانوس آرام، در سراسر خلیج‌فارس و سواحل شرقی افریقای جنوبی و میان اندونزی، استرالیا و سواحل جنوبی ژاپن و چین و در سراسر خلیج‌فارس و دریای عمان، دریاهای گرمسیری و نیمه گرمسیری پراکنده است. بیشترین میزان صید ماهی حلوا سیاه در سواحل ایرانی خلیج‌فارس 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، ازجمله 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 live: IBOL)، پایگاه داده استانداردشده‌ای عنوان مرجع توالی همه ماهیان ایجاد کرده است. در تاکسونومی، DNA بارکدینگ برای شناسایی مرسوم نمونه‌ها به کار می‌رود، درحالی‌که در مطالعات فیلوژنتیک، DNA بارکدینگ به‌عنوان نقطه آغاز برای انتخاب بهینه تاکسون به کار می‌رود و توالی بارکدها (خط شناسه‌ها) به پایگاه داده‌ها جهت تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیکی اضافه می‌شود

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-07]

(Abbas *et al*., 2017). سپس اطلاعات در یک پایگاه داده جهت ارزیابی فاصله ژنتیکی درون و بین‌گونه‌ای تجزیه‌وتحلیل 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 ایکتیوپلانکتون‌ها (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 موسسه از بیش از ۴۰ کشور عضو رسمی کنسرسیوم جهانی بارکدینگ بوده و در قالب سه گروه به فعالیت درزمینه 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 رادارند (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 توالی یابی 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 (Alcantara and Yambot, 2016؛ Abdullah and Rehbein, 2017).

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 ازجمله 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 موردمطالعه در این مطالعه در ایران می‌باشد، در سال ۱۳۹۸ انجام گرفت. از هر نمونه، طبق روش استاندارد، حداقل ده قطعه از باله شنای گونه‌های موردمطالعه (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 هرگونه، برداشته شد. سپس در الکل ۹۶ درصد تثبیت گردید و درنهایت جهت انجام آزمایش‌های مولکولی، به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان (بندرعباس) منتقل شدند.

استخراج DNA با روش فنل–کلروفرم از باله شنای گونه‌های موردمطالعه 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 درنهایت رسوب دادن DNA از بافت‌ها با اتانول مطلق استفاده گردید (Taggart *et al*., 1990).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-07]

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

کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده 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 پلیمراز (PCR) با استفاده از ترکیبی حدود ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج‌شده در یک واکنش به میزان ۲۵ ماکرو لیتر حاوی ۶ ماکرو لیتر از آغازگرهای پیشرو و معکوس FISH1F:5’TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3’ و FISH1R: 5’TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3’، ۱۰ میلی‌مولار dNTP۱۰، ۲۵ میلی‌مولار MgCl2 و نیز آنزیم تگ DNA پلیمراز (Taq DNA Polymerase) استفاده شد. جهت بهینه‌سازی شرایط واکنش، در مرحله اول با دادن دامنه حرارتی، بهترین دمای اتصال (Temperature Annealing) هرکدام از آغازگرها به رشته الگو به دست آمد و در مرحله بعد به‌منظور اخذ بهترین و شفاف‌ترین باندها و حذف باندهای ناخواسته، اقدام به بهینه کردن محصول PCR از طریق تغییر غلظت‌های DNA،MgCl2 ژنومی و dNTP گردید. سیکل حرارتی استفاده‌شده 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 (Anealing) ۵۴ درجه به مدت یک دقیقه و مرحله بسط (Extension) ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و درنهایت دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود.

در این پژوهش، ۵۶۰ جفت باز قابل‌اطمینان از قسمتی از ژنوم mtDNA بنام COI و با استفاده از آغازگرهای مشترک بین‌گونه‌ای که در مطالعات مختلف جهت بارکدینگ گونه‌های مختلف استفاده می‌شود، با موفقیت توالی یابی و جهت بررسی فایلوژنی 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 به‌دست‌آمده سنجیده شد. پس از دریافت توالی‌ها، بازنگری توالی‌های مشابه با نرم‌افزار Chromas-23.2 انجام شد. به‌منظور 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

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-07]

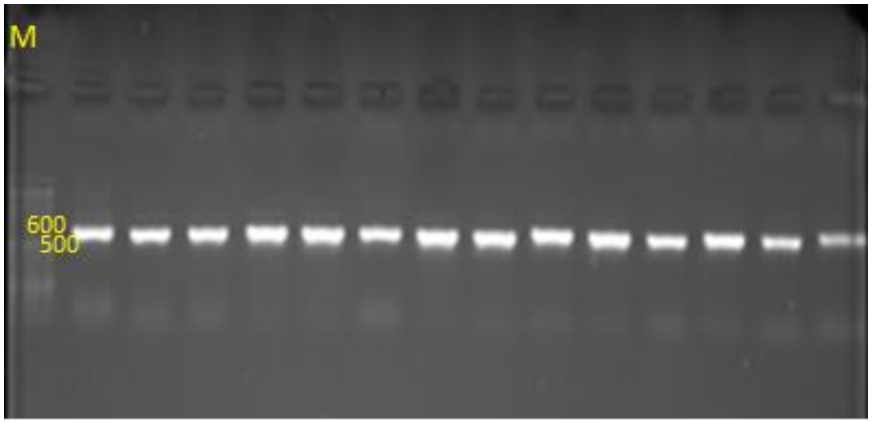
Kimura 2-parameter با در نظر گرفتن میزان Bootstap با هزار بار تکرار با استفاده از نرم‌افزار MEGA ۶ رسم گردید (Kimura, 1980).

نتایج

DNA های استخراج‌شده از باله‌های شنای دو گونه موردمطالعه 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 تجزیه‌وتحلیل 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 موردمطالعه در بانک جهانی ژن (NCBI).

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



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

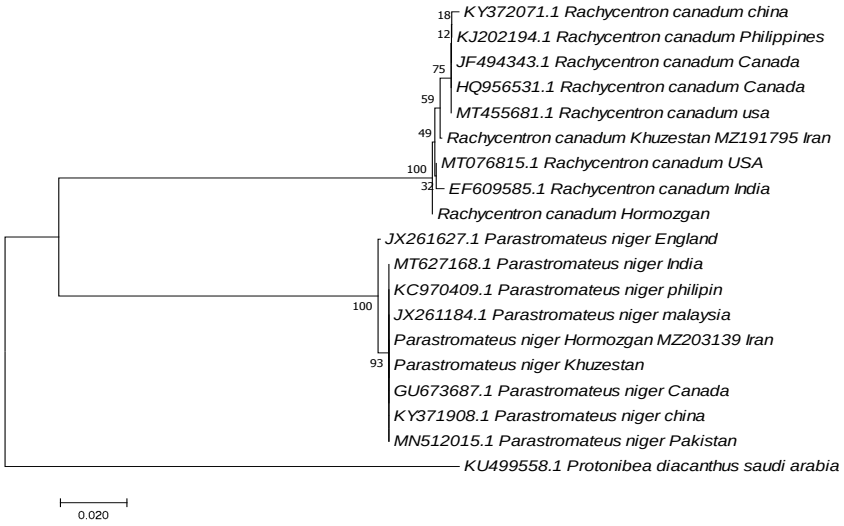
ریخت‌شناسی حاصل از ترسیم درخت تکاملی Neighbor-Joining به‌روش فاصله Kimura 2-parameter بسیار عمیق است که وجود دو شاخه اصلی را نشان می‌دهد که نمونه‌های گونه سوکلا با اختلاف ژنتیکی ۰/۲۴ درصدی بین این‌گونه و گونه حلوا سیاه در دو شاخه مجزا قرار گرفتند. در ارتباط با گونه حلوا سیاه مشاهده می‌شود که این‌گونه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

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-07]

هند و مالزی ندارد. نکته قابل‌توجه در این زمینه، شناسایی یک هاپلوتایپ جدید از گونه سوکلا در منطقه خلیج‌فارس می‌باشد که در شاخه اول به‌صورت مجزا با اختلاف ژنتیکی از دیگر نمونه‌های ثبت‌شده مانند هند، آمریکا، عربستان سعودی و چین در بانک جهانی ژن متمایز گردیده است.

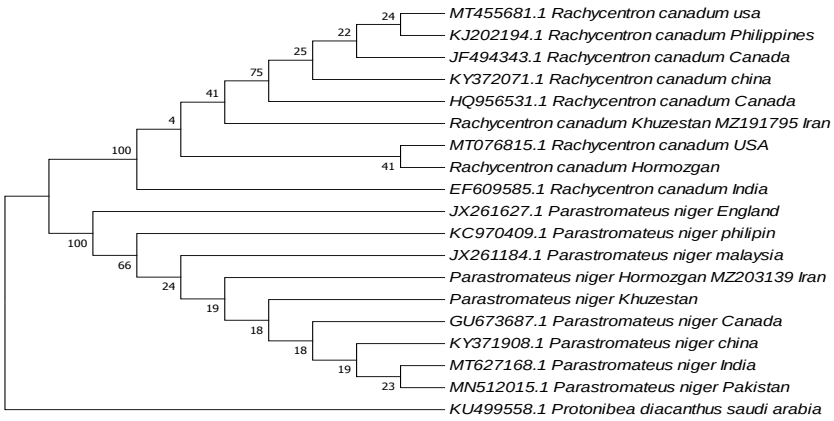
جدول ۲: در صد فاصله ژنتیکی توالی‌های ژن COI دو گونه ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) و حلوا سیاه (*Parastromateus niger*) در منطقه خلیج‌فارس در مقایسه با نمونه‌های گزارش‌شده از مناطق دیگر.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. MT076815.1 Rachycentron canadum USA																			
2. EF609585.1 Rachycentron canadum India	0.00																		
3. Rachycentron canadum Hormozgan	0.00	0.00																	
4. Rachycentron canadum Khuzestan MZ191795 Iran	0.00	0.00	0.00																
5. MT455681.1 Rachycentron canadum usa	0.01	0.01	0.01	0.00															
6. HQ956531.1 Rachycentron canadum Canada	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00														
7. KY372071.1 Rachycentron canadum china	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00													
8. JF494343.1 Rachycentron canadum Canada	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00												
9. KJ202194.1 Rachycentron canadum Philippines	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00											
10. MT627168.1 Parastromateus niger India	0.21	0.22	0.21	0.21	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22										
11. KC970409.1 Parastromateus niger philipin	0.21	0.22	0.21	0.21	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.00									
12. JX261184.1 Parastromateus niger malaysia	0.21	0.22	0.21	0.21	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.00	0.00								
13. Parastromateus niger 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. Parastromateus niger 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 Parastromateus niger 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 Parastromateus niger 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 Parastromateus niger 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 Parastromateus niger 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 Protonibea diacanthus 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	

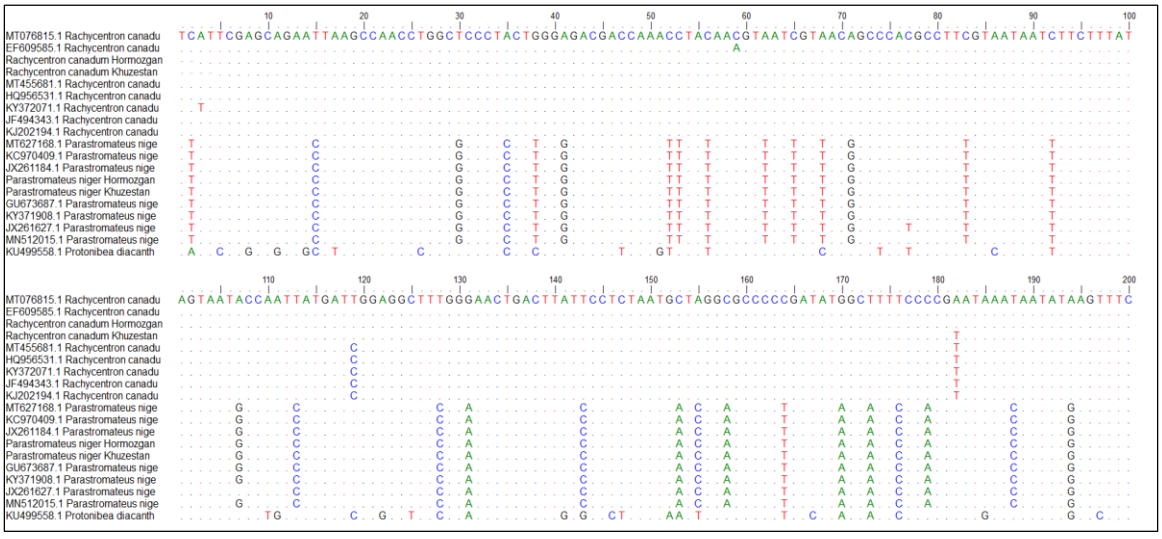


[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-07]

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



شکل ۴: درخت فایلوژنی ژن COI دو گونه ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) و حلوا سیاه (*Parastromateus niger*) در منطقه خلیج‌فارس در مقایسه با نمونه‌های گزارش‌شده 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 خلیج‌فارس در مقایسه با نمونه‌های گزارش‌شده از مناطق دیگر.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-07]

بحث و نتیجه‌گیری

ژنوم میتوکندری به یک نشانگر مولکولی قدرتمند برای تجزیه‌وتحلیل ژنتیکی تبدیل‌شده است که می‌تواند مکان‌های اطلاعاتی ژنتیکی بیشتری را فراهم کند و دارای حفاظت بالا و ویژگی‌های ساختاری ساده است (li *et al*., 2021). در این پژوهش، قسمتی از ژنوم mtDNA بانام ژن COI و با استفاده از آغازگرهای مشترک بین‌گونه‌ای که در مطالعات مختلف جهت بارکدینگ گونه‌های مختلف استفاده می‌شود، با موفقیت تکثیر و تعیین توالی گردید و حدود ۶۵۰ جفت باز تکثیر و با جداسازی بازهای انتهایی مشکوک، ۵۶۰ جفت باز قابل‌اطمینان جهت بررسی فایلوژنی انتخاب شدند که این توالی‌ها جهت ثبت در بانک جهانی ارائه شد. یکی از اهداف مهم بارکدینگ ژنی گونه‌های ارزشمند، حفاظت از آن‌گونه‌ها می‌باشد (Omir *et al*., 2020). درخت فایلوژنی ژن COI دو گونه ماهی سوکلا و حلوا سیاه در منطقه خلیج‌فارس در مقایسه با نمونه‌های گزارش‌شده از مناطق دیگر به‌روش 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 به‌عنوان برون گونه (Out Group) با اختلاف ژنتیکی ۰/۲۵ درصدی بین این‌گونه و دو گونه یادشده دور از انتظار نبود (شکل ۳). در ارتباط با گونه حلوا سیاه مشاهده می‌شود که این‌گونه ازلحاظ تفاوت ژنتیکی بررسی‌شده اختلاف چندانی با نمونه‌های گزارش‌شده از هند و مالزی ندارد که این امر بیانگر آن است که مهاجرت این‌گونه به سایر نقاط دنیا نتوانسته است تنوع هاپلوتایپی خاصی را ایجاد کند که این امر می‌تواند به علت صید بی‌رویه و نیز از دست دادن زیست‌گاه‌های این‌گونه بوده است که منجر به کاهش آلل‌ها و به‌تبع آن کاهش تنوع ژنتیکی می‌شود (Sheraliev *et al*., 2021). همچنین این عدم تنوع را می‌توان در گونه سوکلا مشاهده کرد که با توجه به مهاجر بودن این‌گونه انتظار می‌رفت که بتواند تنوع هاپلوتایپی قابل‌ملاحظه‌ای را ایجاد نماید، ولی با توجه به اینکه در حال حاضر صید این‌گونه در آب‌های ایران بسیار پایین آمده است، احتمال از دست دادن آلل‌ها بسیار بالا است. از طرف دیگر مرکزی در جزیره قشم اقدام به واردات ماهیان انگشت قد جهت تکثیر این‌گونه نموده است که با توجه به استفاده بیش‌ازحد از مولدین و افزایش میزان هم‌خونی در بین جمعیت‌های پرورشی و ورود احتمالی آن‌ها به دریا می‌توان انتظار داشت که در آینده نزدیک تنوع ژنتیکی این‌گونه پایین‌تر آمده و این‌گونه دستخوش صدمات جدی درزمینه کاهش رشد و باز ماندگی گردد. این‌گونه جزو گونه‌های درجه‌یک محسوب شده و قاعدتاً صید بالایی در مورد این‌گونه اعمال می‌گردد. گر چه شناسایی و وجود یک هاپلوتیپ مجزا ازاین‌گونه با اختلاف ژنتیکی یک‌درصدی با نمونه‌های هند، آمریکا و عربستان سعودی قابل کامل می‌باشد که نشان‌دهنده ایجاد تنوع هاپلوتیپی متوسط این‌گونه در خلیج‌فارس می‌باشد که به‌طورقطع نمونه‌برداری در آینده با تعداد نمونه‌های بیشتر می‌تواند مؤید این نظریه باشد (جدول ۲). در این حال، تراز تنوع هاپلوتیپی می‌تواند از صفر (تمام افراد جمعیت دارای هاپلوتیپ یکسان) تا یک (تمام افراد جمعیت دارای هاپلوتیپ‌های متفاوت) متغیر باشد. به‌طورکلی، میزان تنوع هاپلوتیپی متوسط تا بالا برای گونه‌های دریایی غیرمعمول 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 گونه‌های دریایی نسبت داده می‌شود که منجر به نگهداری بسیاری از هاپلوتیپ‌های منحصربه‌فرد در طول رشد و پراکنش جمعیت می‌گردد (Bingpeng, 2017). البته اندازه جمعیت ممکن است در مناطق مختلف جغرافیایی به دلیل کاهش یا افزایش جمعیت ناشی از عوامل کاهنده مانند مرگ‌ومیر و افزاینده مانند ورود نوپاها و رشد فردی، به‌طور مرتب در حال تغییر بوده و درنتیجه 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 تأثیرگذار هستند نیز ممکن است باعث بروز الگوهای متفاوت تنوع ژنتیکی شوند (Chang *et al*., 2017). یکی از مهم‌ترین عواملی که می‌تواند در تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت گونه‌های مختلف منطقه دخالت داشته باشد، وجود سدهای فیزیکی و یا گیاهی در مناطق موردبررسی می‌باشد (Tiedeman *et al*., 2000). وجود خوریات و جنگل‌های حرا در هر منطقه، تأثیر زیادی بر میزان تنوع ژنتیکی آبزیان دارد (Hubert *et al*., 2019). جنگل‌های حرا، یکی از مهم‌ترین مناطق نوزادگاهی و تغذیه لارو میگو و ماهیان به‌حساب می‌آیند که باعث می‌شود بعضی از گونه‌ها نقاط خاص نوزادگاهی را به خود اختصاص داده و تمایل کمتری به مهاجرت داشته

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-07]

باشند (Yang *et al*., 2021). در همین ارتباط این‌گونه ازلحاظ تجاری در گرید A قرار می‌گیرد و به نسبت دیگرگونه‌های موردبررسی از میزان صید بالایی برخوردار است که این امر نیز می‌تواند در این مطالعه موردتوجه قرار گیرد. البته در همین ارتباط می‌توان به این نکته اشاره کرد که بااین‌حال، بارکدگذاری DNA با تمام مزایای آن، محدودیت‌های زیادی دارد، ازجمله این روش به یک کتابخانه DNA قابل‌اعتماد 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 ازجمله ژنتیک جمعیت، اکولوژی جمعیت، بیولوژی حفاظت از گونه‌ها و غیره از اهمیت زیادی برخوردار است (Omir *et al*., 2020). مبادله ژن‌ها بین جمعیت‌ها، توالی‌های آللی 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 خلیج‌فارس، شاهد ایجاد جریان ژنی و افزایش تنوع ژنتیکی بین این‌گونه 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 خلیج‌فارس 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 کلائی، س.، سواری، ا.، ذوالقرنین، ح. و نبوی، س. م. ب.، ۱۳۸۷. مقایسه ژنتیکی جمعیت‌های ماهی سوکلای (*Rachycentron canadum*) خلیج‌فارس و دریای عمان با استفاده از روش میکروستلایت. 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 خلیج‌فارس و دریای عمان با استفاده از ژن NADH dehydrogenase subunit 2(ND2). 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-Magd, 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.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-07]

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., Dahruddin, 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 chaetognath *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.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-07]

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 routin 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.

Froese, 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.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-07]

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-07]