





Genetic Diversity study of Hilsa shad (*Tenualosa ilisha* (Hamilton, 1822)) using AFLP markers in Persian Gulf

Hakimeh Fekrandish^{1*} , Abdolrahim Pazira¹ , Hossein Maheri¹ 

1. Department of Fisheries, Bushehr Branch, Islamic Azad University, Bushehr, Iran.

Article history:

Received: 29 October 2022
Revised: 25 January 2024
Accepted: 26 January 2024
ePublished: 22 April 2024

*Corresponding author: Hakimeh Fekrandish, Department of Fisheries, Bushehr Branch, Islamic Azad University, Bushehr, Iran

E-mail: hfekrandish@yahoo.com

Abstract

Hilsa shad (*Tenualosa ilisha*) is a marine pelagic species that migrates to the river to spawn. In order to investigate the diversity, differentiation and population structure of hilsa shad using the Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) marker in the northern waters of the Persian Gulf from Abadan, Dilam and Bushehr regions, a total of 25 fish were sampled from the caudal fin tissue in June 2019. Then the examined samples were fixed in 96% ethanol and transferred to the laboratory. After extracting DNA from tissues by phenol chloroform method, five MseI/EcoRI primer combinations were used in genetic diversity analysis by AFLP method. Then genetic analysis was done using GeneAlex, Popgen and TFPGA software. The percentage of polymorphic bands was 11.99%. Average of Nei's genetic diversity was 0.285 ± 0.029 , and average of Shannon's index was 0.429. The results of AMOVA analysis indicated that 20% of the genetic variation contained within populations and 80%. Based on PCA component analysis and genetic distance dendrogram (UPGMA), it was determined that the degree of separation of populations was based on their geographical distance from each other. So that Abadan and Dilam samples have the lowest genetic distance and Bushehr and Abadan samples have the highest genetic distance. What can be estimated from the present study is that there are separate populations of this fish in the Persian Gulf.

Keywords: Genetic variation, Population, Hilsa shad, AFLP marker, Persian Gulf.

Please cite this article as follows: Fekrandish H, Pazira A; Maheri H. Genetic Diversity study of Hilsa shad (*Tenualosa ilisha* (Hamilton, 1822)) using AFLP markers in Persian Gulf. J Marin Bio, 2024; 16(1): 16-26. DOI:



Copyright © 2024 Journal of Marine Biology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite

تنوع ژنتیکی ماهی صبور (*Tenualosa ilisha*(Hamilton, 1822) در خلیج

فارس با استفاده از نشانگرهای AFLP

حکیمه فکراندیش^{۱*}، عبدالرحیم پذیرا^۱، حسین ماهری^۱

۱. گروه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بوشهر، بوشهر، ایران.

چکیده

ماهی صبور (*Tenualosa ilisha*) یک گونه سطح‌زی دریایی است که برای تخم‌ریزی به رودخانه کوچ می‌کند. به‌منظور بررسی تنوع، تمایز و ساختار جمعیت ماهی صبور با استفاده از نشانگر چند-شکلی طولی قطعه تکثیرشده (Amplified Fragment Length Polymorphism) در آب‌های شمال خلیج فارس از مناطق آبادان، دیلم و بوشهر، از بافت باله دمی در مجموع ۲۵ ماهی در خردادماه ۱۳۹۹ نمونه‌برداری گردید. سپس نمونه‌های موردبررسی در اتانول ۹۶ درصد فیکس شده و به آزمایشگاه انتقال یافت. پس از استخراج DNA از بافت‌ها به روش فنل کلروفرم، در بررسی تنوع ژنتیکی با روش AFLP، از پنج ترکیب پرایمری MseI/EcoRI استفاده شد. سپس آنالیز ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزارهای GeneAlex، Popgen و TFGA انجام شد. این پنج ترکیب پرایمری مجموعاً ۲۶۳ باند قابل امتیازدهی و ۳۲ باند پلی‌مورف تولید کردند. آنالیز داده‌ها نشان داد که میانگین درصد لوکوس‌های پلی‌مورفیک در بین سه جمعیت ماهیان صبور ۱۱/۹۹ درصد، میانگین تنوع ژنتیکی $0.0 \pm 285/029$ و میانگین شاخص شانون 0.429 بود که نشان از تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها داشت. نتایج آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) در سطح ۹۹ درصد اختلاف بین سه جمعیت را ۲۰ درصد و درون جمعیت‌ها را ۸۰ درصد نشان داد. بر اساس تجزیه و تحلیل مؤلفه PCA و دندروگرام فاصله ژنتیکی (UPGMA) مشخص گردید که میزان تفکیک جمعیت‌ها بر اساس فاصله جغرافیایی آن‌ها از یکدیگر بوده است. به‌طوری‌که نمونه‌های آبادان و دیلم کمترین فاصله ژنتیکی و نمونه‌های بوشهر و آبادان بیشترین فاصله ژنتیکی را دارند. آنچه از مطالعه حاضر می‌توان برآورد نمود این است که جمعیت‌های مجزایی از این ماهی در خلیج فارس وجود دارد.

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی، جمعیت، ماهی صبور، نشانگر AFLP، خلیج فارس.

تاریخچه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۸/۷

تاریخ ویرایش مقاله: ۱۴۰۲/۱۱/۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۱/۶

تاریخ انتشار مقاله: ۱۴۰۳/۲/۳

تمامی حقوق برای دانشگاه آزاد اهواز محفوظ است.

* نویسنده مسئول: حکیمه فکراندیش، گروه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بوشهر، بوشهر، ایران

ایمیل: hfekrandish@yahoo.com

استناد: فکراندیش، حکیمه؛ پذیرا، عبدالرحیم؛ ماهری، حسین. تنوع ژنتیکی ماهی صبور (*Tenualosa ilisha*(Hamilton, 1822) در خلیج فارس با استفاده از

نشانگرهای AFLP. مجله زیست‌شناسی دریا، بهار ۱۴۰۳؛ ۱۶(۱):۱۶-۲۶

مقدمه

ماهی صبور یک‌گونه پلاژیک-نریتیک و رود کوچ است که در آب‌های گرمسیری تا عمق ۲۰۰ متر یافت می‌شود. به‌طور عمده فیلتر کننده و پلانکتون خوار است، اما در بسترهای گلی کرم نیز می‌خورد. این ماهی در آب‌های خلیج فارس، بخش شمالی خلیج بنگال، دریای عرب، بخش جنوبی دریای چین، دیده می‌شود (Sultana et al., 2022).

ماهی صبور فقط در بخش‌های شمالی خلیج فارس، در محدوده شمال غربی خلیج، شمال تا مصب رودخانه شط العرب در عراق و رودخانه‌های دیگر در ایران پراکنش دارد. این ماهی در رودخانه شط العرب تا منطقه تالابی بزرگ شمال شهر بصره، عراق بالا می‌رود. بالاترین محدوده پراکنش شمالی تالاب‌الحممر، ۱۸۰ کیلومتری شمال شهر بصره تا ۲۲۰ کیلومتری در رود کارون و انشعاباتش در ایران می‌باشد (Al-Yamani et al., 2007).

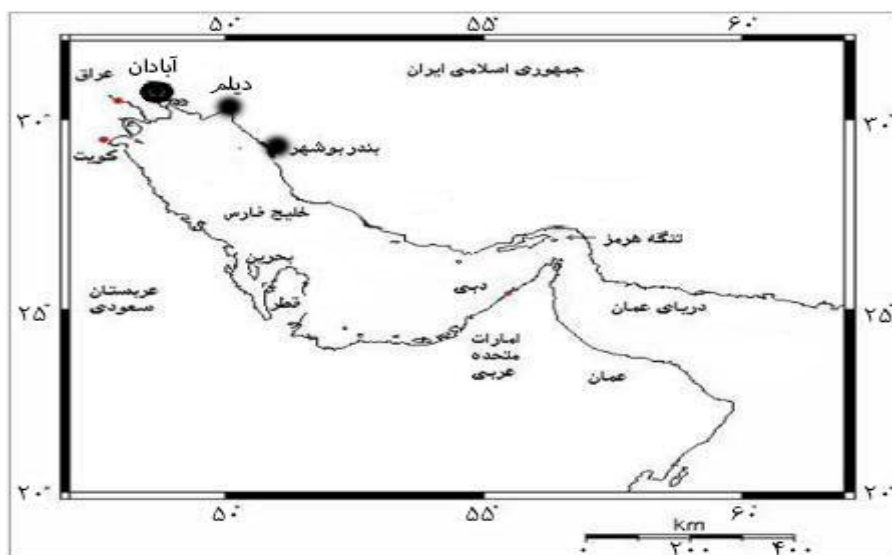
بر اساس اطلاعات موجود در این منطقه یک کاهش ۲۰ تا ۲۵ درصدی در میزان صید ماهی صبور در خلیج فارس در ۱۰ سال گذشته رخ داده است. علاوه بر صیادی، این‌گونه از طریق شوری و کاهش گسترده زیستگاه مردابی ناشی از احداث سد‌ها تهدید می‌گردد و به‌عنوان گونه‌ای نزدیک به انقراض در لیست ثبت‌شده استاین کاهش احتمالاً ناشی از صید بیش‌ازحد می‌باشد. این ماهی گونه‌ای به‌شدت آسیب‌پذیر در رودخانه شط العرب است که به علت مسدود شدن مسیر مهاجرت مولدین به مکان‌های تخم‌ریزی با تور گوش‌گیر در رودخانه تیگراس، اوفراتس و کارون می‌باشد. عوامل طبیعی دیگر (آلودگی، سد‌ها، توسعه سواحل) جریان آب شیرین طبیعی را محدود کرده و مکان‌های تخم‌ریزی برای این‌گونه را به‌طور دائمی تخریب کرده است (IUCN, 2022).

از مسائل مهم بیولوژی و اکولوژی ماهی صبور شناخت تنوع درون‌گونه‌ای و جمعیت‌های آن می‌باشد که می‌تواند به حل مسائل بیولوژی، اکولوژی، حفاظت و ارزیابی ذخایر آن کمک کند. از آنجایی‌که اطلاعات در مورد ژنوم ماهی صبور در حال حاضر اندک می‌باشد، در این پروژه با استفاده از روش AFLP به بررسی ساختار جمعیتی این‌گونه در خلیج فارس پرداخته می‌گردد. نشانگر AFLP دارای کارایی بسیار در ارزیابی تنوع درون جمعیتی و بین جمعیت‌ها می‌باشند. در این روش نیاز به اطلاعات اولیه از ژنوم موجود نمی‌باشد و حتی اگر هیچ اطلاعاتی از توالی ژنوم موجود نباشد محدودیت ایجاد نمی‌کند، به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای هزینه را در یک آنالیز کاهش داده و همچنین پلی مورفیسم زیادی را نشان می‌دهند (Hiransuchalert et al., 2020). تاکنون میزان تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های ماهیان مختلفی در خلیج فارس با استفاده از نشانگرهای AFLP بررسی شده است. تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ماهی مید (*Liza klunzingeri*) در دو منطقه هندیجان و خور زیارت با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP بررسی گردید. نتایج نشان داد ماهیان هندیجان و خور زیارت در دو گروه مجزا قرار دارند و این نشانگر قادر به تشخیص جمعیت‌های جدا از یکدیگر در این دو منطقه می‌باشد (فقیه‌احمدانی و همکاران، ۱۳۹۰). در تحقیقی دیگر شریفی و همکاران (۱۳۹۲) با بررسی تنوع ژنتیکی ماهی حلوا سیاه (*Paraestomateus niger*) در خلیج فارس ۳ جمعیت این‌گونه را در مناطق آبادان، بوشهر و بندرعباس شناسایی کردند. Fekrandish و همکاران (2015) در بررسی تنوع، تمایز و ساختار جمعیت ماهی زمین کن دم‌ناری (*Platycephalus indicus*) با استفاده از نشانگر AFLP در آب‌های شمال خلیج فارس، با نمونه‌برداری از شش منطقه در سواحل خوزستان (خور موسی و بحرکان)، بوشهر (شیف و مطاف) و هرمزگان (چارک و بندرعباس)، با استفاده از ۱۰ ترکیب پرایمری MseI/EcoRI نشان دادند که میانگین درصد لوکوس‌های پلی‌مورفیسم در بین شش جمعیت ماهیان زمین کن دم‌ناری ۵۷/۰۶ درصد، میانگین تنوع ژنتیکی ۰/۲۰۰±۰/۰۰۸ و میانگین شاخص شانون ۰/۳۰۰±۰/۰۱۱ بود که نشان از تنوع ژنتیکی بالای جمعیت‌ها داشت. حیات و همکاران (۱۳۹۳) در بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کوت‌دهان زرد با استفاده از نشانگر AFLP در خلیج فارس و دریای عمان، از ۵ ترکیب پرایمری MseI/EcoRI استفاده شد. این پنج ترکیب پرایمری مجموعاً ۲۰۳ باند قابل امتیازدهی و ۲۲ باند پلی‌مورف تولید کردند. آنالیز داده‌ها نشان داد که میانگین درصد لوکوس‌های پلی‌مورفیسم در بین سه جمعیت ماهیان کوت‌دهان زرد ۱۰/۷۶ درصد، میانگین تنوع ژنتیکی ۰/۲۰۰±۰/۰۰۸ و میانگین شاخص شانون ۰/۴۳۲±۰/۰۳۱ بود که نشان از تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها بود.

با انجام این پروژه جمعیت‌های این‌گونه، قرابت بین جمعیت‌ها و تنوع درون‌گونه‌ای به دست آمد که این اطلاعات در حفاظت، ارزیابی ذخایر و تکثیر و پرورش این‌گونه کاربرد زیادی دارد.

مواد و روش‌ها

با توجه به پراکنش ماهی صبور در آب‌های جنوب ایران، سواحل آبادان، دیلم و بوشهر در خلیج فارس به‌عنوان مناطق نمونه‌برداری انتخاب شدند (شکل ۱). بدین‌صورت که در مجموع ۲۵ نمونه ماهی صبور در خردادماه ۱۳۹۹ از مناطق موردنظر (۸ عدد ماهی صبور از آبادان، ۸ عدد ماهی از دیلم و ۹ عدد ماهی از بوشهر) صید و به آزمایشگاه انتقال یافت. پس از بیومتری نمونه‌ها از بافت باله دمی آن‌ها نمونه‌برداری و در اتانول ۹۶ درصد فیکس گردید.



شکل ۱: نقشه مناطق نمونه‌برداری در خلیج فارس.

در این تحقیق DNA ژنومی با روش استاندارد فنل-کلروفورم از باله دمی جدا شد (Hillis and Moritz, 1990). آزمایش‌های مربوط به AFLP مطابق با پروتکل Vos و همکاران (۱۹۹۵) با اندکی تغییرات انجام شد. ابتدا ۳۰۰ ng از DNA ژنومی با ۱۰ واحد آنزیم MseI و EcoRI در بافر آنزیم محدودکننده (10x) در دمای ۳۷ سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت هضم انجام شد. ۵ میکرو لیتر محلول الحاق آدپتورهای دو رشته‌ای ۲/۵ میکرو لیتر بافر لیگاز T4 DNA (10x) + ATP، ۵/۵ میکرو لیتر پرایمرهای MseI و EcoRI ۵۰ پیکو مول و ۰/۴ میکرو لیتر لیگاز T4 DNA (10x) به ۲۰ میکرو لیتر محصول هضم آنزیمی اضافه شد و در دمای ۲۲ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. واکنش PCR پیش انتخابی با استفاده از دستگاه مولد چرخه‌های حرارتی با یک جفت پرایمر حاوی یک نوکلئوتید اضافی در انتهای ۳ خود انجام شد. واکنش در دمای اتصال ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. مخلوط حاصل ۱۰ برابر با آب مقطر رقیق شد و به‌عنوان الگو برای PCR انتخابی استفاده شد. واکنش PCR انتخابی در ۲۰ میلی‌لیتر حجم حاوی ۵ میلی‌لیتر محصول واکنش PCR پیش انتخابی، ۲ میکرو لیتر بافر 10X PCR، ۱ میکرو لیتر از هر ۲/۵ میلی مولار، ۱ میکرو لیتر از هر آغازگر MseI و EcoRI ۱۰ پیکومول و ۰/۳ میکرو لیتر از آنزیم تگ DNA پلیمرز ۰/۵ واحد بر روی یک گرادیان چرخه حرارتی انجام شد. برنامه چرخه‌های حرارتی با مشخصات چرخه اول یک چرخه ۲ دقیقه‌ای در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، چرخه وسط شامل واسرشته سازی: ۳۰ چرخه ۳۰ ثانیه‌ای در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ چرخه ۳۰ ثانیه‌ای در ۶۵ درجه سانتی‌گراد (۱ درجه سانتی‌گراد در هر چرخه)، الحاق: ۳۰ ثانیه در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد و بسط: ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس

چرخه سوم با مشخصات ۱ چرخه ۵ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۱ چرخه ۳۰ ثانیه در ۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل پلی‌آکریل آمید ۶ درصد (PAGE) به مدت ۲/۵ ساعت در دستگاه (۳۸×۳۰) DNasequencing gel ۷۵ وات انجام شد و در نهایت باندها با استفاده از تکنیک اصلاح‌شده رنگ‌آمیزی نیترا نقره از Zeng و همکاران (2020) شناسایی شد. توالی آداپتورها و پرایمر های AFLP در جدول ۱ فهرست شده است. پنج ترکیب پرایمر که برای تجزیه و تحلیل AFLP انتخاب شدند، عبارت بودند از: (E-ATC/M-CTG، E-AAG/M-CCC، E-ACC/M-CAG، E-ACT/M-CAT، E-AGC/M-CCT) (جدول ۱).

جدول ۱: توالی آداپتورها و پرایمر های مورد استفاده در مطالعه حاضر.

توالی	پرایمر	
5' - GACGATGAGTCCTGAG - 3'	EcoRI-Adaptor	آداپتورها
5' - TACTCAGGACTCAT - 3'		
5' - CTCGTAGACTGCGTACC - 3'	MseI-Adaptor	
5' - AATTGGTACGCAGTCTAC - 3'		
5'-GACTGCGTACCAATTC-3'	EcoRI	پرایمر های PCR پیش انتخابی
5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'	MseI	
5'-GACTGCGTACCAATTCATC-3'	E-ATC/M-CTG	پرایمر های PCR انتخابی
5'-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'		
5'-GACTGCGTACCAATTC AAG-3'	E-AAG/M-CCC	
5'-GATGAGTCCTGAGTAAACCC-3'		
5'-GACTGCGTACCAATTCACC-3'	E-ACC/M-CAG	
5'-GATGAGTCCTGAGTAAACAG-3'		
5'-GACTGCGTACCAATTC ACT-3'	E-ACT/M-CAT	
5'-GATGAGTCCTGAGTAAACAT-3'		
5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3'	E-AGC/M-CCT	
5'-GATGAGTCCTGAGTAAACCT-3'		

باندها به صورت وجود (۱) یا عدم وجود باند (۰) امتیازدهی شدند و داده‌ها به نرم‌افزار Excel منتقل گردید و معیارهای مختلف تنوع درون جمعیتی مورد بررسی و محاسبه قرار گرفت. آنالیز آماری درصد باند پلی مورفیسم، تعداد آل‌های مشاهده شده Na، تعداد آل‌های مؤثر Ne، تنوع ژنتیکی، شاخص شانون I، میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بر اساس Nei (۱۹۷۸)، میزان Fst (Excoffier et al., 2005) آنالیز واریانس مولکولی (تست AMOVA) در سطح خطای ۰/۰۱ در نرم‌افزار GeneAlex (Peakall and Smouse, 2006) و نرم‌افزار Popgen (Yeh et al., 1999) بین جمعیت‌های ۳ منطقه مورد محاسبه قرار گرفت. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای که نشان‌دهنده قرابت افراد است، بر اساس روش UPGMA برای هر جمعیت در نرم‌افزار TFPGA (Version.1) انجام شد.

نتایج

نوکلئوتیدهای انتخابی و ترکیبات پرایمر استفاده شده در این تحقیق، بر اساس نتایج پژوهش Liu و همکاران (۲۰۰۹) و دیگر محققان بر ماهی صبور که پلی مورفیسم خوبی نشان داده بودند، انتخاب گردید و نتایج قابل قبولی را ارائه دادند. ۵ ترکیب آغازگر به کاررفته که توالی نوکلئوتید انتخابی ۳ هر یک از آن‌ها در جدول ۲ آمده است، در مجموع ۲۶۳ باند قابل امتیازدهی تولید کردند که ۳۲ باند آن چند شکل بودند. بنابراین درصد باندهای پلی مورفیسم ۱۱/۹۹ درصد محاسبه شد. تعداد نوارهای تولیدشده توسط هر جفت آغازگرهای مورد استفاده، از ۴۷ تا ۶۱ و تعداد نوارهای پلی مورف از ۴ تا ۹ عدد متغیر بود (جدول ۲).

جدول ۲: تعداد باندهای کل و باندهای چند شکل امتیازدهی شده حاصل از ۵ ترکیب پرایمر در ماهی صبور (*Tenualosa ilisha*).

	جفت پرایمر	تعداد کل باندها	تعداد باندهای پلی مورف	درصد باندهای پلی مورف
A	E-ATC/M-CTG	۴۷	۴	% ۸/۵۱
B	E-AAG/M-CCC	۶۱	۹	% ۱۴/۷۵
C	E-ACC/M-CAG	۵۱	۶	% ۱۱/۷۶
D	E-ACT/M-CAT	۵۰	۶	% ۱۲
E	E-AGC/M-CCCT	۵۴	۷	% ۱۲/۹۶
-	جمع کل	۲۶۳	۳۲	-
-	میانگین	۵۲/۶	۴/۴	% ۱۱/۹۹

فراوانی آلی و هتروزایگوتی (Allele Frequencies by Population (AFP)، فراوانی آلل‌ها در هر لوکوس جمعیت را نشان می‌دهد. تعداد باندهای پلی‌مورف ماهیان صبور بوشهر ۲۹ عدد، دیلم ۳۱ عدد و آبادان ۲۰ عدد بوده است. میانگین باندهای پلی‌مورفیسم ۸۰/۲۱ درصد بیان شد. میانگین هتروزایگوتی یا تنوع ژنتیکی برای ماهیان صبور بوشهر 0.29 ± 0.325 ، دیلم 0.23 ± 0.332 و آبادان 0.34 ± 0.199 محاسبه شد. این بررسی‌ها نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی بیش‌تر در ماهیان صبور دیلم است، چنانچه درصد پلی‌مورفیسم در گروه ماهیان صبور دیلم ۹۳/۷۵ درصد بود. تعداد باندهای اختصاصی در ماهیان دیلم ۲ عدد و بوشهر و آبادان صفر بود، اما فراوانی آن‌ها بیش از ۰/۵ باند است. به‌عبارت‌دیگر هیچ باند اختصاصی برای این سه گروه وجود ندارد (جدول ۳).

جدول ۳: نتایج حاصل از آنالیز الگوی آلی ماهیان صبور (*Tenualosa ilisha*) بوشهر، دیلم و آبادان.

شاخص	مکان نمونه‌برداری	بوشهر	دیلم	آبادان	میانگین
تعداد باند		۲۹	۳۱	۲۰	-
تعداد باند پلی‌مورفیسم		۲۹	۳۱	۲۰	-
باندهای اختصاصی		۰	۲	۰	-
تنوع ژنتیکی (Nei's, 1978) He		0.29 ± 0.325	0.23 ± 0.332	0.34 ± 0.199	0.285 ± 0.29
درصد باندهای پلی‌مورفیسم		% ۷۸/۵	% ۹۳/۷۵	% ۵۹/۳۸	% ۸۰/۲۱
تعداد آلل‌های مشاهده‌شده Na		۱/۷۸۱	۱/۹۰۶	۱/۲۱۹	۱/۶۳۵
تعداد آلل‌های مؤثر Ne		۱/۵۷۵	۱/۵۳۰	۱/۳۳۰	۱/۴۷۸
شاخص شانون I		۰/۴۹۱	۰/۴۹۳	۰/۳۰۳	۰/۴۲۹

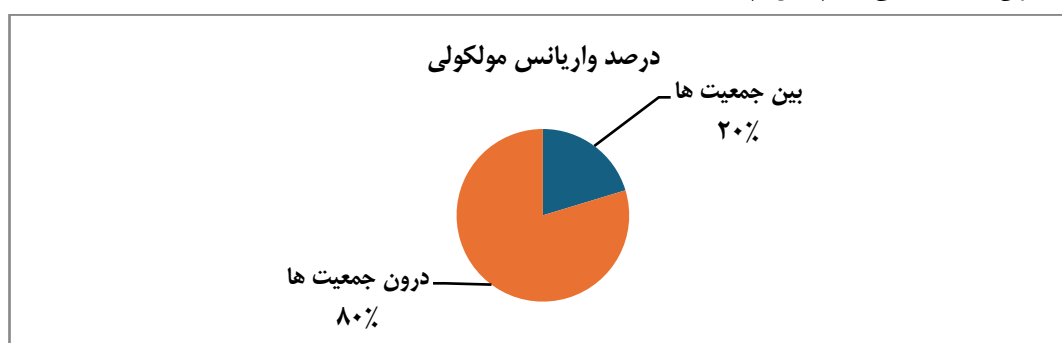
نتایج حاصل از ماتریکس فاصله ژنتیکی بر مبنای ضریب Nei، بیشترین فاصله ژنتیکی بین ماهیان دیلم و بوشهر ۰/۱۴۸ و کمترین فاصله ژنتیکی بین ماهیان دیلم و آبادان ۰/۰۹۹ را نشان داد (جدول ۴).

همچنین نتایج حاصل از ماتریکس شباهت ژنتیکی بر مبنای ضریب Nei، بیشترین شباهت ژنتیکی بین ماهیان دیلم و آبادان ۰/۹۰۵ و کمترین شباهت ژنتیکی بین ماهیان دیلم و بوشهر ۰/۸۶۳ را نشان داد (جدول ۴).

جدول ۴: شباهت ژنتیکی (بالا) و فاصله ژنتیکی (پایین) بر اساس ضریب (Nei, 1978).

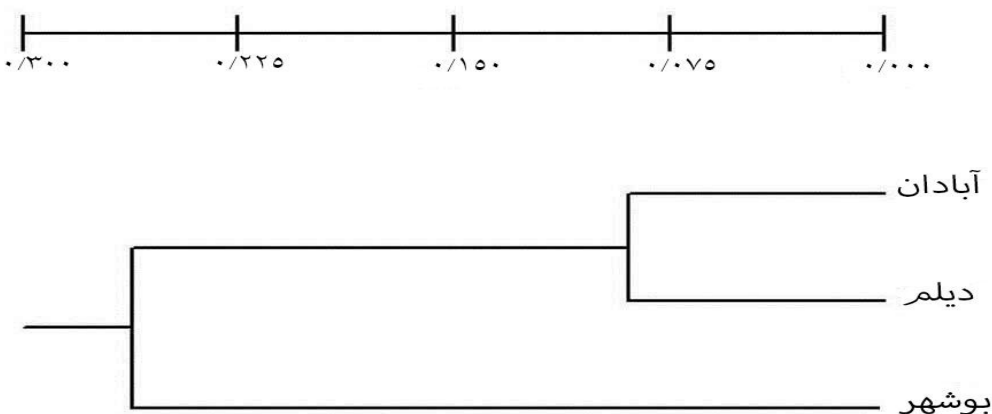
منطقه	بوشهر	دیلم	آبادان
بوشهر	*****	۰/۸۶۳	۰/۸۷۷
دیلم	۰/۱۴۸	*****	۰/۹۰۵
آبادان	۰/۱۳۱	۰/۰۹۹	*****

آنالیز واریانس مولکولی AMOVA در سطح ۹۹ درصد، بیانگر اختلاف بین جمعیتی ماهیان بوشهر، دیلم و آبادان به میزان ۲۰ درصد و اختلاف درون جمعیتی به میزان ۸۰ درصد می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲: آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) بین و درون جمعیتی نمونه‌های ماهی صبور (*Tenualosa ilisha*).

تجزیه و تحلیل خوشه‌ای نشان‌دهنده‌ی قرابت افراد است، دندروگرام ترسیم‌شده بر اساس روش UPGMA در نرم‌افزار TFPGA دو گروه را نشان داد. در اولین گروه ماهیان آبادان و دیلم (با بیشترین شباهت ژنتیکی) در یک کلاستر قرار گرفتند، دومین گروه ماهیان بوشهر بود (شکل ۳).



شکل ۳: دندروگرام فاصله ژنتیکی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده ماهی صبور (*Tenualosa ilisha*) از مناطق مختلف بر اساس UPGMA در نرم‌افزار TFPGA (Nei, 1978).

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق به منظور بررسی تنوع و ساختار ژنتیک جمعیت و شناسایی و تفکیک جمعیت‌های ماهی صبور در خلیج فارس، از نشانگر مولکولی AFLP، با توجه به قابلیت‌ها و توانایی‌های آن مثل عدم نیاز به اطلاعات اولیه ژنوم جهت بررسی این موضوع استفاده شد.

در این تحقیق، ۲۶ قطعه ماهی صبور خلیج فارس مورد آزمایش قرار گرفتند که ۸ عدد ماهی از آب‌های آبادان، ۹ عدد از دیلم و ۹ عدد از بوشهر بوده است. ۵ ترکیب پرایمر EcoR I/MseI به کار گرفته شد که ۲۶۳ باند قابل امتیازدهی و ۳۲ باند پلی‌مورف تولید نمودند. درصد باندهای پلی‌مورفیسیم ۱۱/۹۹ محاسبه شد. در پژوهشی که بر روی گونه *Mugil liza* با استفاده از ۱۵ ترکیب پرایمر انجام شد، ۵۲۹ باند ایجاد کرد که از این میان، ۱۶۵ باند پلی‌مورف ایجاد شد و باندهای پلی‌مورف ایجادشده توسط پرایمر در محدوده ۹ تا ۷۴ باند بود. داده‌هایی که توسط آنالیز آلوزایم‌ها و AFLP به دست آمد بیانگر این بود که تنوع ژنتیکی در محدوده ۰/۰۴۳-۰/۰۱۱ با میانگین ۰/۳۰۳ می‌باشد که سطوح پایینی از تنوع ژنتیکی را نسبت به دیگر گونه‌های کفال ماهیان نشان داد (Aguirre-Pabón et al., 2022). همچنین Lin و همکاران (۲۰۰۹) تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ۹۱ نمونه از ۶ جمعیت ماهی شوریده زرد *Larimichthys polyactis* را در سه منطقه خلیج بوهایی، دریای زرد و شرق دریای چین با استفاده از ترکیب ۳ پرایمر AFLP بررسی نمودند. تعداد نمونه‌ها از هر جمعیت از ۱۱ تا ۲۱ عدد متغیر بود. در مجموع ۲۱۸ باند قابل امتیازدهی تولید شد که ۱۴۸ باند پلی‌مورف بودند. در مقایسه با مطالعات مذکور می‌توان عنوان کرد تعداد نمونه‌های مورد استفاده در این تحقیق و همچنین تعداد باندهای پلی‌مورف ایجادشده نسبت به ترکیبات پرایمر به کار گرفته‌شده در حد نرمال بوده است.

بر اساس آنالیز تنوع ژنتیکی ماهی صبور در مناطق مختلف نمونه‌برداری، بیشترین درصد باند پلی‌مورفیسیم ماهی صبور در خلیج فارس به ترتیب در منطقه دیلم، بوشهر و سپس آبادان مشاهده شد. کاهش میزان پلی‌مورفیسیم در جمعیت منطقه آبادان نسبت به سایر مناطق، دلایل مختلفی از جمله آلودگی‌های ایجادشده توسط استقرار صنایع مختلف از جمله پتروشیمی، وجود اسکله‌های متعدد و تردد شناورها و نیز ورود آب‌های سطحی و خصوصاً فاضلاب به دریا دارد. do Carmo Langiano و Martinez (۲۰۰۸) نیز نشان دادند که ماهی *Prochilodus lineatus* در رودخانه اوربان در جنوب برزیل دارای کاهش تنوع ژنتیکی ناشی از آلودگی آن محیط می‌باشد. Hassanien و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی تنوع ژنتیکی تیلاپیا *Oreochromis niloticus* در رودخانه نیل در مصر، بیشترین درصد باندهای پلی‌مورفیسیم را در منطقه کیونا گزارش نمودند که ناشی از تفاوت جغرافیایی زیاد این منطقه با سایر مناطق مورد بررسی می‌باشد. در پژوهش حاضر، نمونه‌های دیلم دارای درصد بالای پلی‌مورفیسیم بودند ولی برخلاف نتایج Hassanien و همکاران (۲۰۰۴) به نظر نمی‌رسد این درصد بالای پلی‌مورفیسیم تابع فاصله جغرافیایی زیاد با سایر مناطق باشد. در این منطقه آلودگی کمتر محیط دریا نسبت به دونقطه دیگر تغییرات محیطی فراوانی را ایجاد کرده که می‌توان احتمال داد این درصد بالای پلی‌مورفیسیم تابع این تغییرات نیز باشد.

در خصوص دامنه هتروزایگوسیتی و تنوع ژنتیکی بر اساس ضریب Nei's (1978) بیشترین این مقدار در ماهیان صبور منطقه بوشهر (۰/۰۲۳) و کمترین در ماهیان آبادان (۰/۰۳۴ ± ۰/۱۹۹) وجود داشت. میانگین دامنه هتروزایگوسیتی ماهی صبور در خلیج فارس (۰/۲۸۵ ± ۰/۰۲۹) به دست آمد. همچنین در خصوص تنوع بر اساس شاخص شانون، کمترین این میزان در ماهیان آبادان (۰/۳۰۳) و بیشترین در ماهیان دیلم (۰/۴۹۳) محاسبه شد. میانگین تنوع ژنتیکی ماهی صبور بر اساس شاخص شانون ۰/۴۲۹ به دست آمد. در مقایسه با تحقیق حاضر، بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سنگسر معمولی در خلیج فارس با استفاده از نشانگر AFLP بیانگر کمترین میزان تنوع ژنتیکی سنگسر معمولی در منطقه بندرعباس (۰/۲۳۹) و بیشترین در منطقه آبادان با مقدار (۰/۳۳۱) بود (سالاری‌علی‌آبادی و همکاران، ۱۳۹۰). همچنین در بررسی دیگری در گونه زمین کن دم نواری با نشانگر AFLP توسط Fekrandish و همکاران در سال 2015، جمعیت بحرکان و بندرعباس در مقایسه با ۴ جمعیت دیگر در خلیج فارس (خور موسی، شیف، مطاف، چارک) تنوع هتروزایگوسیتی و میزان پلی‌مورفیسیم کمتری را نشان دادند.

کمتر بودن مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده‌شده در نمونه‌های آبادان ممکن است به علل مختلف از جمله عدم بهره‌برداری بهینه از منابع شیلاتی و احتمالاً پایین بودن میزان جریان ژنی (Nm) و تخریب زیستگاه‌های طبیعی ناشی از سبب فاضلاب شهری و صنایع بزرگ که در مجاورت دریا قرار

دارند و پساب‌های سکوه‌های نفتی و پساب پالایشگاه‌ها باشد که باعث آلودگی زیستگاه‌های طبیعی است. از دلایل دیگر این مسئله که توسط محققان مختلف اشاره می‌شود صید بی‌رویه، استرس‌های زیست‌محیطی، تخریب زیستگاه‌های طبیعی و آمیزش‌های خویشاوندی در نتیجه کوچک شدن جمعیت است که با گذشت زمان موجب کاهش آلل و کاهش هتروزیگوسیتی در ذخایر می‌شود (Ghasemi and Pourjam, 2021).

فاکتور F_{st} توصیف‌کننده تمایز جمعیت‌ها در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی می‌باشد و بیانگر آن است که هرچه میزان جریان ژنی بین مناطق بیشتر باشد اختلاف ژنتیکی کمتر است. به بیان دیگر، یکی از بهترین روش‌ها برای بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها تست تمایز ژنتیکی F_{st} بین نمونه‌هاست (Weir and Cockerham, 1984). در بررسی حاضر، کمترین مقدار F_{st} بین جمعیت دیلم و بوشهر (۰/۲۴۴) و بیشترین مقدار F_{st} بین جمعیت بوشهر و آبادان (۰/۳۹۷) محاسبه شد. آنالیز نتایج نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی تقریباً بالا بین جمعیت آبادان در شمال غرب خلیج فارس و جمعیت بوشهر است. این مسئله می‌تواند ناشی از مهاجرت کم جمعیت‌های این گونه بین مناطق مورد پراکنش باشد.

Mickett و همکاران در سال ۲۰۰۳، در گربه‌ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) میزان F_{st} برابر با ۰/۴۴۵۶ را تمایز ژنتیکی زیاد بین جمعیت‌ها و میزان ۰/۱۷۶ را تمایز ژنتیکی متوسط بین جمعیت‌ها عنوان می‌کنند. همچنین Zhao و همکاران در سال ۲۰۱۱ در ماهی حلوا سفید تمایز ژنتیکی متوسطی برابر با ۰/۱۱ بین جمعیت‌های مورد بررسی تعیین نمودند. Fekrandish و همکاران نیز در سال 2015 در ماهی زمین کن دم نواری در خلیج فارس مقدار F_{st} برابر با ۰/۳۲۷ و در نتیجه تمایز ژنتیکی زیاد بین جمعیت‌ها را مشخص نمودند. در این بررسی میانگین F_{st} برابر با ۰/۱۹۲ و با اختلاف معنی‌دار در بین جمعیت‌ها ($P < 0.01$) محاسبه شد که بیانگر ساختار جمعیتی قوی و تمایز بالای ژنتیکی است و نشان‌دهنده مهاجرت کم بین جمعیت‌ها می‌باشد. این مسئله با فرضیه بیولوژی این گونه که سرعت شنای کند دارد و دارای رفتار schooling است مطابقت دارد. در رفتار schooling تمایل به درون آمیزی در هر جمعیت بیشتر است (Carpenter et al., 1997). جمعیت‌هایی که به صورت گروهی زندگی می‌کنند و رفتار schooling دارند نتایج یک والد با یکدیگر طلاق داشته و هموزی جمعیتی به صورت درازمدت باعث تمایز بسیار با جمعیت‌های دیگر می‌شود. به طور کلی سطوح پایینی از تمایز ژنتیکی بین مناطق مختلف پراکنش در ماهیان دریایی به چند دلیل وجود دارد: اول این که عدم وجود مانع قابل توجه و سیالیت محیط‌های دریایی که باعث کاهش هتروژنتیکی در بین جمعیت‌ها می‌شود. دوم این که مهاجرت ماهیان بالغ یا نوجوان بین مناطق مختلف دریا و رودخانه (مخصوصاً ماهی صبور که رود کوچ می‌باشد) که باعث از بین رفتن تفاوت ژنتیکی میان جمعیت‌ها می‌شود و سوم این که گونه‌های دریایی دارای زادآوری بالا و پراکنش وسیع و غالباً با تخم و لارو پلاژیک هستند که با جریان‌های دریایی و اقیانوسی پراکنش می‌یابند (Hiransuchalert et al., 2020).

نتایج آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) در سطح ۹۹ درصد، اختلاف بین ۳ جمعیت را ۲۰ درصد و اختلاف درون جمعیتی را ۸۰ درصد نشان داد. اختلاف درون جمعیتی می‌تواند به دلیل تفاوت ژنتیکی بین افراد باشد، اما قسمت زیادی از تفاوت مشاهده‌شده بین جمعیت‌ها در مناطق مختلف احتمالاً به علت تفاوت‌های محیطی از جمله ساختارهای اقیانوس‌شناسی متفاوت، فاصله‌های جغرافیایی و چرخه بیولوژی گونه‌ها است و اغلب تصور می‌شود که قسمت کمی از این تفاوت‌ها به طور ژنتیکی تعیین می‌شود (Nazia et al., 2021). در الگوی کلی ساختار ژنتیک جمعیت، اختلاف ژنتیکی درون جمعیتی در ماهیان دریایی بیشتر از اختلاف ژنتیکی بین جمعیت‌هاست که همان‌گونه که بیان گردید می‌تواند ناشی از موانع اقیانوسی یا زمینی باشد که باعث جلوگیری از پراکندگی می‌شود. با تشدید توسعه شهرنشینی و نواحی صنعتی، بعضی از زیستگاه‌های تخم‌ریزی، مکان‌های نوزادگاهی و تغذیه‌ای از بین رفته‌اند که بنابراین ممکن است جمعیت‌های متفاوتی را در بعضی از زیستگاه‌های جدا شده درون یک ناحیه با فاصله جغرافیایی کوتاه به وجود آورد (Hiransuchalert et al., 2020). خلیج فارس به دلیل نیمه بسته بودن و ورود مقادیر زیادی آلاینده‌های صنعتی و شهری به درون این اکوسیستم به نظر می‌رسد می‌تواند چنین تأثیری را القا کند و تفاوت درون جمعیتی بیشتری نسبت به تفاوت بین جمعیتی در گونه‌های آبریان به وجود آورد.

از سوی دیگر طبق دندوگرام فاصله ژنتیکی رسم شده برای ماهی صبور (شکل ۳)، نمونه‌های این ماهی به دو کلاستر تقسیم شد که کلاستر اول شامل نمونه‌های آبادان و دیلم و کلاستر دوم شامل ماهیان بوشهر بود که به ترتیب فاصله ژنتیکی قرار می‌گیرند. این دندوگرام نشان می‌دهد که اولاً نمونه‌های ماهی صبور از آبادان و دیلم کمترین فاصله ژنتیکی را باهم دارند و بیشترین فاصله ژنتیکی را گروه بوشهر دارد. با توجه به یافته‌های این پژوهش و تجزیه و تحلیل‌های انجام شده می‌توان عنوان نمود اگرچه نشانگر AFLP تنوع ژنتیکی مناسبی در درون هر یک از جمعیت‌های گونه صبور تشخیص داد، اما اختلاف مولکولی چندانی بین جمعیت‌های موجود در مناطق نمونه‌برداری شده وجود ندارد. بر اساس آنالیز نتایج، تنوع ژنتیکی ماهیان آبادان نسبت به ماهیان دیلم و بوشهر کمتر بود و این تفاوت را می‌توان احتمالاً به میزان صید زیاد این گونه و شرایط نامساعدتر محیطی از جمله آلودگی بالای این منطقه و تخریب زیستگاه‌های طبیعی ماهیان صبور نسبت به دو منطقه دیگر نسبت داد. در الگوی کلی ساختار ژنتیک جمعیت، اختلاف ژنتیکی درون جمعیتی در ماهیان دریایی بیشتر از اختلاف ژنتیکی بین جمعیت‌هاست که همان‌گونه که بیان گردید می‌تواند ناشی از موانع اقیانوسی یا زمینی باشد که باعث جلوگیری از پراکندگی می‌شود. با تشدید توسعه شهرنشینی و نواحی صنعتی، بعضی از زیستگاه‌های تخم‌ریزی، مکان‌های نوزادگاهی و تغذیه‌ای از بین رفته‌اند که بنابراین ممکن است جمعیت‌های متفاوتی را در بعضی از زیستگاه‌های جدا شده درون یک ناحیه با فاصله جغرافیایی کوتاه به وجود آورد (Zeng et al., 2020). خلیج فارس به دلیل نیمه بسته بودن و ورود مقادیر زیادی آلاینده‌های صنعتی و شهری به درون این اکوسیستم به نظر می‌رسد می‌تواند چنین تأثیری را القا کند و تفاوت درون جمعیتی بیشتری نسبت به تفاوت بین جمعیتی در گونه‌های آبزیان به وجود آورد. آنچه از مطالعه حاضر می‌توان برآورد نمود این است که احتمالاً جمعیت‌های مجزایی از ماهی صبور در خلیج فارس وجود دارد. از آنجا که نتایج این بررسی اثبات مولکولی از وجود زیر جمعیت‌های ماهی صبور در خلیج فارس است، بنابراین می‌توان نتایج حاضر را برای حفاظت از ذخیره ژنتیکی این گونه با ارزش و مدیریت و کنترل میزان صید در خلیج فارس مفید دانست. بنابراین بایستی با نظارت بر برنامه‌های مدیریتی در خصوص میزان صید و افزایش تحقیقات ژنتیکی و بیولوژیکی ماهی صبور در خلیج فارس، به حفاظت بیشتر از این گونه ارزشمند پرداخت.

سپاسگزاری

از تمامی کارکنان آزمایشگاه ژنتیک پژوهشکده دانشگاه خلیج فارس بوشهر که در انجام این تحقیق ما را یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

۱. حیات، ف.، فکراندیش، ح. و مهاجری، ژ.، ۱۳۹۳. مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی کوتر دهان زرد (*Sphyræna obtusata*, Cuvier, 1829) در خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از نشانگرهای AFLP. پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بوشهر، ۸۰ ص.
۲. سالاری علی‌آبادی، م. ع.، راستگو، ع. ر.، محمدی، م.، ارچنگی، ب. و قاسمی، س. ا.، ۱۳۹۰. ساختار جمعیتی ماهی سنگسر معمولی (*Pomadasys kaakan* Cuvier, 1830) با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP در خلیج فارس. مجله علوم و فنون شیلات، ۱ (۱): ۳۷-۲۷.
۳. شریفی، م.، سوری نژاد، ا.، قاسمی، ا. و حسینی، س. ج.، ۱۳۹۲. بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت ماهی حلوا سیاه (*Parastromareus niger*) با استفاده از مارکر AFLP. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه هرمزگان. ۹۵ ص.
۴. فقیه احمدانی، ا.، حسینی، س. ج. و محمدی، غ.، ۱۳۹۰. مطالعه کروموزومی ماهی مید *Liza klunzingeri* و بررسی تنوع ژنتیکی آن در خور زیارت (استان بوشهر) و رودخانه زهره (استان خوزستان) با استفاده از نشانگر AFLP. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی - واحد اهواز. ۱۱۰ ص.

5. **Aguirre-Pabón, J., Berdugo, G. O. and Narváez, J. C., 2022.** Population structure and low genetic diversity in the threatened lebranche *Mugil liza* in the Colombian Caribbean. *Fisheries Research* , 256, 106485.
6. **Al-Yamani, F. Y., Bishop, J. M., Al-Rifaie, K. and Ismail, W., 2007.** The effects of the river diversion, Mesopotamian marsh drainage and restoration, and river damming on the marine environment of the northwestern Arabian Gulf. *Aquatic Ecosystem health & management*, 10(3), 277-289.
7. **Carpenter, K., Krupp, F., Jones, D. and Zajonz, U., 1997.** The living marine resources of Kuwait, eastern Saudi Arabia, Bahrain, Qatar, and the United Arab Emirates. *FAO Species identification field Guide for fishery purposes*. P: 29.
8. **do Carmo Langiano, V., & Martinez, C. B. 2008.** Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative biochemistry and physiology part C: toxicology & pharmacology*, 147(2), 222-231.
9. **Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S., 2005.** Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics*, 1, 117693430500100003.
10. **Fekrandish, H., Hosseini, S.J., Kamali, A. and Soltani, M., 2015.** Assessing genetic diversity of populations of bartail flathead (*Platycephalus indicus* Linnaeus, 1758) in the Northern part of the Persian Gulf using AFLP markers. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14: 924-936.
11. **Ghasemi, S. A. and Pourjam, F., 2021.** Population Genetic Structure and Genetic Diversity of *Cobia (Rachycentron canadum)* in the Persian Gulf and Makran Sea. *Taxonomy and Biosystematics*, 13(48): 33-46. doi: 10.22108/tbj.2021.128640.1160.
12. **Hashemi, S. A. R. and Valinassab, T., 2011.** Stock assessment of demersal resources in the West northern Of Persian Gulf waters. *World J. Fish and Marine Sci.*, 3(6): 480-485.
13. **Hassanien, H. A., Einady, M., Obeida, A. and Itriby, H., 2004.** Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly (RAPD). *American Naturalist*, 107: 285-297.
14. **Hillis, D. M. and Moritz, C., 1990.** *Molecular taxonomy*. Sinauer Associates Inc Publishers. Sunderland, Massachusetts. U.S.A. 120 p.
15. **Hiransuchalert, R., Tongiang, B., Sae-Chua, C., Cherdsakulkij, C., Prasertlux, S., Khamnamtong, B. and Klinbunga, S., 2020.** The development of species-specific AFLP-derived SCAR and SSCP markers to identify mantis shrimp species. *Molecular Biology Reports*, 47: 6807 - 6816.
16. **IUCN., 2022.** The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. Available at: www.iucnredlist.org.
17. **Lin, L. S., Ying, Y. P., Han, Z. Q., Xiao, Y. S. and Gao, T. X., 2009.** AFLP analysis on genetic diversity and population structure of small yellow croaker *Larimichthys polyactis*. *African Journal of Biotechnology*, 8: 2700-2706.

18. Liu, J. Y., Lun, Z. R., Zhang, J. B. and Yang, T. B., 2009. Population genetic structure of striped mullet, *Mugil cephalus*, along the coast of China, inferred by AFLP fingerprinting. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37: 266-274.
19. Mickett, K., Morton, C., Feng, J., Li, P., Simmons, M., Cao, D., Dunham, R. A. and Liu, Z., 2003. Assessing genetic diversity of domestic populations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in Alabama using AFLP markers. *Aquaculture*, 228: 91-105.
20. Moritz, C., 1994. Defining 'evolutionary significant units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9: 373-375.
21. Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
22. Nazia, A. K., Tãm, B. M., Jamaluddin, J. A. and Nor, S. A., 2021. High genetic structure between natural populations of bighead catfish *Clarias macrocephalus* (Günther, 1864) from the Mekong Delta and Peninsular Malaysia. *Fisheries Research*, 241: 105993.
23. Nurulamin, S. M., Rahman, M. A., Hadler, G. C., Mazid, M. A., Milton, D. A. and Blaber S. J. M., 2004. Stock assessment and Management of *Tenualosa ilisha* in Bangladesh. *Asia Fisheries Science*, 17: 50-59.
24. Peakall, R. and Smouse, P. E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology*, 6: 288-295.
25. Qian, X., Fei, C., Shin, P. K. S., Cheung, S. G., Yan, C. and Caihuan, K., 2011. AFLP analysis of genetic variation among three natural population of horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* along Chinese coast. *Chinese journal of Oceanology and limnology*, 29:284-289.
26. Sultana, S., Hasan, M. M., Hossain, M. S., Alim, M. A., Das, K. C., Moniruzzaman, M. and Alam, J., 2022. Assessment of genetic diversity and population structure of *Tenualosa ilisha* in Bangladesh based on partial sequence of mitochondrial DNA cytochrome b gene. *Ecological Genetics and Genomics*, 25: 100139.
27. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
28. Weir, B. S. and Cockerham, C. C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358- 1370.
29. Yeh, F. C., Yang, R. C. and Boyle, T., 1999. POPGENE Version 1.32: Microsoft Windows Based Freeware for Population Genetic Analysis, Quick User Guide. Center for International Forestry Research, University of Alberta, Canada.
30. Zhao, F., Dong, Y., Zhuang, P., Zhang, T., Zhang, L., & Shi, Z. 2011. Genetic diversity of silver pomfret (*Pampus argenteus*) in the Southern Yellow and East China Seas. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(2): 145-150.
31. Zeng, Z., Liang, D., Li, J., Lyu, Z., Wang, Y. and Zhang, P., 2020. Phylogenetic relationships of the Chinese torrent frogs (Ranidae: Amolops) revealed by phylogenomic analyses of AFLP-Capture data. *Molecular phylogenetics and evolution*, p.106753.