



مقاله علمی - پژوهشی:

مطالعه ساختار جمعیت ماهی خارو باله سفید (*Chirocentrus nudus* (Swinson, 1839) در سواحل خلیج فارس با روش‌های ریخت‌سنجی و DNA Barcoding

حکیمه فکراندیش*

*h.fekrandish@iaau.ac.ir

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

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۲

چکیده

برای مطالعه ساختار ژنتیکی و ریخت‌سنجی جمعیت ماهی خارو باله سفید *Chirocentrus nudus* از سه منطقه آبادان، شیف و بندرعباس در سواحل خلیج فارس، از هر ایستگاه ۲۰ عدد و در مجموع ۶۰ قطعه ماهی خارو باله سفید با تور گوشگیر در اردیبهشت ماه ۱۳۹۹ صید گردید. ۲۹ صفت ریخت‌سنجی و ۵ صفت شمارشی اندازه‌گیری گردید. برای مطالعه ژنتیکی به روش DNA Barcoding^۱ از طریق توالی‌یابی ژن سیتوکروم اکسیداز میتوکندری (COI) نیز قطعه‌ای از باله دمی ۶ نمونه ماهی از هر ایستگاه شیف، آبادان و بندرعباس، در اتانول ۹۶ درصد قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. استخراج DNA به روش فنل کلروفرم و با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با یک جفت پرایمر انجام گرفت. بعد از توالی‌یابی یا بارکد ژن COI، ردیف کردن توالی‌ها صورت گرفت. نتایج حاصل از تعیین توالی نشان داد که قطعه تکثیر شده ۵۹۵ جفت باز طول دارد. ژن COI در ناحیه‌ای که مورد مطالعه قرار گرفته بوده، در تمام نمونه‌ها- مشابه همدیگر بود. همچنین نتایج آنالیز تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) برای صفات ریخت‌سنجی نشان داد که تعداد ۹ عامل با مقادیر ویژه بزرگ‌تر از ۱ انتخاب شدند که ۸۴/۵۶ درصد شامل تنوع صفات ریخت‌سنجی است. نمودار پراکنش بر اساس مؤلفه‌های اول و دوم، دندروگرام صفات ریخت‌سنجی و ترسیم درخت فیلوژنی با نرم افزار Maximum linkhood, Neighbor-joining و UPGMA نشان داد که ماهی خارو باله سفید در شمال خلیج فارس دارای حداقل دو جمعیت است.

کلمات کلیدی: خارو باله سفید، ریخت‌سنجی، توالی‌یابی، بارکد ژن COI

^۱ Biological identifications through DNA barcodes (DNA Barcoding)

مقدمه

شرایط زیست محیطی مناسب در خلیج فارس باعث گردیده که این منطقه محل زیست گونه‌های متعددی از آبزیان مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری باشد. گونه‌های مختلفی از آبزیان کف‌زی، صخره‌ای و نزدیک به کف و سطح‌زیان نیز در خلیج فارس دیده می‌شوند (Siddeek et al., 1999). در میان ماهیان سطح‌زی، ماهی خارو باله سفید که در نزدیکی سطح آب و نزدیک ساحل تا عمق ۱۲۰ متری زیست می‌کنند، ماهیانی با اهمیت از لحاظ اقتصادی - تجاری شیلاتی هستند. جمعیت‌های مختلف یک گونه ماهی اغلب ویژگی‌های ریختی گوناگونی نشان می‌دهند. این تفاوت‌های ریختی می‌تواند اساساً نتیجه عوامل ژنتیکی، محیطی یا اثرات متقابل هر دوی آن‌ها باشد. بنابراین، با مطالعه صفات قابل اندازه‌گیری و صفات قابل شمارش هر یک از ماهیان و به‌کارگیری روش‌های آماری می‌توان تعدادی از صفات ریخت‌سنجی شاخص یک جمعیت را به‌دست آورد. با استفاده از روش‌های ریخت‌سنجی می‌توان تأثیرات محیط زیست و پاسخ‌های انعطاف‌پذیری ریختی مربوطه در ماهیان را مطالعه کرد. همچنین می‌توان برای اهدافی همچون شناسایی گونه‌ها، مطالعات ارزیابی ذخایر ماهیان و ... استفاده کرد (Omir et al., 2020).

امروزه به لطف پیشرفت‌های علم زیست شناسی مولکولی، از نشانگرهای DNA، به عنوان ابزار موثری و بسیار دقیق در جهت شناسایی گونه‌های مختلف موجودات استفاده می‌شود که می‌تواند تضمین یا ردی بر شناسایی‌هایی باشد که بر اساس خصوصیات ریختی انجام شده است. شناساگر مولکولی DNA Barcoding، سیستمی را برای شناخت و شناسایی گونه‌ها با استفاده از بخش کوچکی از DNA به عنوان بخش استاندارد ژنوم تعریف می‌کند. DNA میتوکندریایی بخش کلیدی برای مطالعات این چنین است، زیرا ژنوم میتوکندری در ساختار و عملکرد در مقایسه با ژنوم هسته، ساده است و همه افراد mtDNA مشابه به والد ماده خود را حمل می‌کنند و این بدان معناست که یک نوع منفرد از مولکول به‌وسیله تولید مثل به ارث می‌رسد (Ovenden et al., 1992). نرخ تکامل DNA میتوکندری ۱۰ بار سریع‌تر از بخش‌های مشابه در ژنوم هسته‌ای است. از سوی دیگر، DNA میتوکندری حاوی اطلاعاتی است که در نشانگرهای هسته‌ای نگهداری نمی‌شود (Brown et al., 1982). ژنوم میتوکندری برهم‌کنش شناخته شده‌ای با محیط

ندارد، بنابراین به‌نظر می‌رسد، تنوع ژنتیکی به‌دست آمده در واقع، بازتابی از وجود جدایی تولید مثل است (Ovenden et al., 1992).

ناحیه ژنی مورد استفاده برای شناسایی، ناحیه ۶۴۸ نوکلئوتیدی در ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) میتوکندری است. این ژن استاندارد باعث فعالیت زیرواحد ۱ آنزیم سیتوکروم اکسیداز (COI) می‌شود. منطقه‌ای از این ژن که برای تعیین بارکد در نظر گرفته شده بود، به اندازه‌ای کوتاه است که توالی جفت بازهای نوکلئیک اسیدهای آن را می‌توان با یک بار خواندن با دستگاه بارکد خوان، رمزگشایی کرد. این منطقه بسیار کوچک در همه سلول‌ها وجود دارد و در گونه‌های مختلف به اندازه‌ای متنوع است که می‌توان گونه را تشخیص داد.

تاکنون مطالعات کمی بر سیستماتیک، بیولوژی و ژنتیک خاروماهیان صورت گرفته و این در حالی است که ابهامات زیادی در ارتباط با زیرگونه‌ها و جمعیت‌های ماهیان آبهای دریایی ایران وجود دارد. Luther (۱۹۹۶) در مقایسه دو گونه خارو ماهیان *C. nudus* و *C. dorab* اقیانوس هند مشخص کرد که سه صفت به منظور جدا سازی این دو گونه مفید هستند. یکی از این سه صفت مفید، رنگ‌بندی باله پشتی آنها است. این ویژگی به منظور جداسازی اولیه دو گونه به‌کار می‌رود. Mathew و همکاران (۱۹۹۹) مقدار کلسترول ۹۷ نمونه ماهی و ۱۷ نمونه از آبزیان پوسته‌دار از آب‌های گرمسیری را اندازه‌گیری کردند. اختلافات زیادی در مقدار کلسترول از خانواده‌های گوناگون ماهی تجزیه و تحلیل شده، مشاهده گردید. نتایج نشان داد، میزان کلسترول عضله ماهی خارو باله سفید ۴۶ درصد است. Haseli و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای بر ده گونه ماهی استخوانی از جمله ماهی خارو باله سفید در شمال خلیج فارس، چندین سستود متعلق به راسته *Tripanoryncha* را جداسازی کردند که سستود *Callitetrarhynchus gracilis* دارای فراوان‌ترین آلودگی در این ماهیان بود.

در مورد مطالعات DNA Barcoding در ایران و جهان پژوهش‌هایی بر سایر گونه‌های ماهیان انجام شده است. نه‌لوندی و همکاران (۱۴۰۰) در بررسی تنوع ژنتیکی و DNA Barcoding دو گونه ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) و حلوا سیاه (*Parastromateus niger*) در خلیج فارس، نشان دادند که گونه سوکلا به همراه حلوا سیاه (با اختلاف ژنتیکی ۰/۲۲ بین این دو گونه)، در دو شاخه مجزا قرار می‌گیرند. گونه حلوا سیاه از لحاظ تفاوت ژنتیکی بررسی شده،

افزایش تکثیر مصنوعی سبب یکسان سازی ژنتیکی می شود (Khomdram, 2018).

در مطالعه حاضر، این امر با استفاده از نشانگرهای ریخت سنجی با هدف تعیین تعداد جمعیت های ماهی خارو باله سفید در حوضه خلیج فارس و تعیین تنوع درون و بین جمعیت های احتمالی آن با استفاده از روش DNA barcoding شناسایی مولکولی ماهی خارو باله سفید و مقایسه آن در سه منطقه در آب های سواحل شمالی خلیج فارس به اجرا درآمد.

مواد و روش کار

روش تحقیق به صورت عملیات میدانی و مطالعات آزمایشگاهی انجام گردید. از استان های بوشهر، خوزستان، هرمزگان به ترتیب در جزیره شیف، آبادان و بندر عباس، نمونه های ماهی خارو باله سفید جمعاً به تعداد ۶۰ ماهی (هر ایستگاه ۲۰ ماهی) با استفاده از تور گوشگیر در اردیبهشت ماه ۱۳۹۹ صید گردید (جدول ۱، شکل ۱). ماهیان در فرمالین ۱۰٪ تثبیت شده و جهت مقایسه ریخت شناسی به آزمایشگاه منتقل شدند و صفات ریخت سنجی و ریخت شماری آنها مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی ۲۹ مشخصه ریخت سنجی و ۵ مشخصه شماری براساس روش Coad (۱۹۹۲) و Halasan و همکاران (۲۰۲۲) انتخاب شدند (جدول ۲). همچنین جهت بررسی ژنتیکی با روش DNA Barcoding، ۶ نمونه ماهی خارو باله سفید از مناطق صیادی آبادان، بوشهر (خارگ) و بندرعباس (۲ عدد از هر مکان) جمع آوری شدند. پس از جداسازی باله دمی آنها و تثبیت کردن در الکل مطلق ۹۶ درصد، جهت انجام مطالعات به آزمایشگاه ژنتیک منتقل گردید.

در روش ریخت سنجی برای یکنواختی واریانس و توزیع نرمال داده ها، به ترتیب از آزمون های تک متغیره لون^۱ و آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده گردید. میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات چند متغیره کلیه صفات ریخت سنجی در هر منطقه محاسبه شدند. برای تعیین اختلاف بین جمعیت های مورد مطالعه در هر یک از صفات از آنالیز واریانس یک طرفه^۲ و آزمون دانکن استفاده گردید (Tizkar et al., 2020).

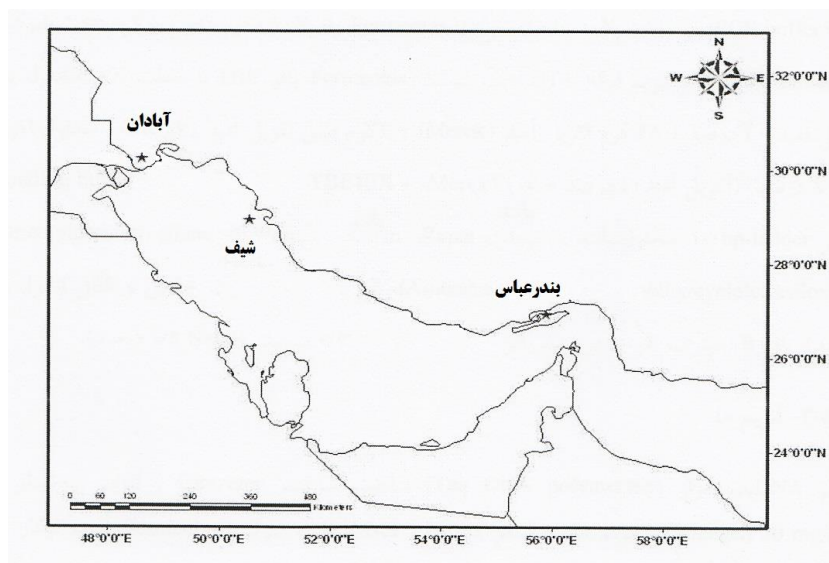
اختلاف چندانی با نمونه های گزارش شده از هند و مالزی نداشت و عدم تنوع در گونه ماهی سوکلا با توجه به مهاجر بودن این گونه بود، هر چند انتظار می رفت که بتواند تنوع هاپلوتایپی قابل ملاحظه ای ایجاد نماید.

Mccusker و همکاران (۲۰۱۳) به بررسی ماهیان اقیانوس اطلس کانادا به روش DNA Barcoding پرداختند که این اطلاعات شامل ۱۷۷ گونه، ۱۳۶ جنس و ۸۱ خانواده و ۲۸ رده بوده که در ۸۸ درصد در یک شاخه متحدالشکل بر اساس ناحیه ژنی بیشتر 500bp از ژن CO1 قرار گرفته بودند و متوسط bootstrap برای این گونه ها، ۹۸ درصد بود. Khedkar و همکاران (۲۰۱۴) به روش DNA Barcoding به بررسی ماهیان رودخانه نارمادا در هند پرداختند که در این مطالعه مجموعاً ۸۲۰ نمونه از ۱۷ منطقه بررسی شده که نمونه ها متعلق به ۸۵ گونه ۶۳ جنس و ۳۴ خانواده بوده و ۳ گونه دیگر که به این رودخانه معرفی شده بودند. پورمظفر و همکاران (۱۳۹۹) DNA Barcoding ماهی زمین کن دمنواری (*Platycephalus indicus*) در سواحل خلیج فارس و مقایسه با نمونه های موجود در بانک ژن نشان دادند، نمونه مورد مطالعه و سایر نمونه های گزارش شده از سایر نقاط دنیا را می توان با فاصله ژنتیکی ۰/۰۲-۰/۰۹۵ به ترتیب با نمونه عربستان سعودی و چین از یکدیگر تمیز داد که این خود مؤید تاثیر استفاده از این ژنوم در بارکدینگ و تعیین فاصله ژنتیکی با توجه به تفرق جغرافیایی و خصوصیات ریختی است. همان گونه که از سوابق برمی آید، استفاده از نشانگرهای ریختی و ژنتیکی در مطالعات جمعیتی ماهی خارو باله سفید در خلیج فارس تا کنون استفاده نشده است.

مطالعات ژنتیک ملکولی به عنوان ابزاری مدرن از توانایی شناسایی و تعیین ساختار ذخایر ماهیان برخوردار است و چشم انداز جدیدی از روابط میان جنس و خانواده و در سطح گونه، تصویری جدیدی از آرایش ماهیان را در گونه ها و روابط بین جمعیت ها ارائه می دهد (Wang et al., 2024). کاهش در ذخایر ژنتیکی جمعیت های ماهیان طبیعی یکی از مشکلات مهم مدیریت شیلاتی محسوب می شود. امروزه نه تنها تنوع ژنتیکی بسیاری از جوامع ماهیان تغییر یافته است بلکه هزاران جمعیت و گونه در اثر آلودگی، بهره برداری های بیش از اندازه، تخریب زیستگاه ها، سد شدن مسیر مهاجرت و سایر توسعه های انسانی به کلی نابود شده اند (Costa et al., 2023). فعالیت های انسانی ساختار جمعیت ها را تا اندازه ای تغییر می دهد که حتی از طریق

¹ Leven test for Equality of Variances

² One-Way ANOVA



شکل ۱: نقشه مکان‌های نمونه‌برداری در شمال خلیج فارس

جدول ۱: مشخصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری

ایستگاه	عرض جغرافیایی (N)	طول جغرافیایی (E)	عمق صید (متر)	فاصله ایستگاه‌ها	کیلومتر
آبادان	۳۰° ۲۰'	۴۸° ۱۷'	۸	آبادان تا شیف	۲۷۲.۰۰۱۸۳۸
شیف	۲۸° ۵۶'	۵۰° ۳۴'	۱۲	شیف تا بندرعباس	۵۵۸.۰۶۸۹۹
بندرعباس	۲۶° ۵۶'	۵۵° ۵۵'	۱۵	آبادان تا بندرعباس	۸۲۲.۸۸۵۱۶۸

جدول ۲: صفات ریخت‌سنجی و ریخت‌شمارشی مورد بررسی در نمونه‌های صید شده

ردیف	صفت (ریختی)	ردیف	صفت (ریختی)	ردیف	صفت (شمارشی)
۱	طول کل TI	۱۶	طول آرواره بالا maxl	۱	تعداد خارهای شعاع‌های باله پشتی
۲	طول استاندارد SI	۱۷	طول آرواره پایین madl	۲	تعداد شعاع‌های سخت و نرم باله مخرجی
۳	طول بدن BI	۱۸	طول باله دمی cl	۳	تعداد شعاع‌های نرم باله سینه‌ای
۴	طول سر hl	۱۹	طول باله پشتی اول d1l	۴	تعداد کل مهره‌ها
۵	عرض سر hw	۲۰	طول باله پشتی دوم d2l	۵	تعداد خارهای آبششی در سطح قوس آبششی
۶	طول پوزه Pro	۲۱	طول باله مخرجی Al		
۷	ارتفاع سر hd	۲۲	ارتفاع باله پشتی اول hD1		
۸	قطر افقی چشم hed	۲۳	ارتفاع باله پشتی دوم hD2		
۹	قطره عمودی چشم ved	۲۴	طول ساقه دمی Cpl		
۱۰	فاصله بین دو چشم lod	۲۵	طول باله سینه‌ای Pl		
۱۱	فاصله پشت چشم pol	۲۶	طول باله شکمی Vl		
۱۲	حداکثر ارتفاع بدن H	۲۷	عرض بدن bw		
۱۳	حداقل ارتفاع بدن h	۲۸	فاصله بین ابتدای باله مخرجی تا ابتدای باله دمی (A-C)		
۱۴	فاصله جلوی باله پشتی pd	۲۹	وزن		
۱۵	فاصله پشت باله پشتی pod				

برای بررسی ژنتیکی، نمونه‌های DNA ماهیان با روش فنل – کلروفرم استخراج شدند. برای بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراجی و تعیین خلوص آن از روش‌های اسپکتوفتومتری و الکتروفورز استفاده گردید. سپس واکنش PCR جهت تکثیر ژن‌های

COI با استفاده از آغازگرهایی مورد استفاده در این تحقیق که مترادف آنها در جدول ۳ ارائه شده است و در شرکت Metabion international AG آلمان سنتز شده‌اند، انجام گردید.

جدول ۳: آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگر	پرایمر
LCO1490	-GGT CAA CAA ATC ATC AAG ATA TTG-35
HCO2198	=TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-35

می‌دهد که سه جمعیت مورد مطالعه از یکدیگر متمایز شدند درحالی‌که کلاستر جمعیت‌های ماهیان شیف و بندرعباس از لحاظ ریخت‌شناسی به یکدیگر نزدیک هستند و از کلاستر آبادان فاصله دارند (شکل‌های ۲ و ۳).

بهینه‌سازی PCR جهت تکثیر ژن CO I از گرادپانت دمایی ۴۰-۵۹ درجه سانتی‌گراد استفاده شد که مناسب‌ترین دما برای اتصال پرایمرها، ۴۴ درجه سانتی‌گراد نشان داده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی COI به‌ترتیب با استفاده از زوج پرایمرهای اختصاصی سنتز شده در شرکت Metabion international AG (جدول ۳) به دو شکل کروماتوگرام و FASTA دریافت گردید.

توالی کروماتوگرام هر نمونه که با استفاده از پرایمرها تعیین شده بود، با استفاده از نرم‌افزار Chromas Pro مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس با استفاده از نرم‌افزار EditSeq و SeqMan طول کامل COI هر نمونه بازسازی شد. نتایج تعیین توالی نشان داد که قطعه تکثیر شده ۵۹۵ جفت باز طول دارد (شکل ۴). مقایسه اولیه توالی حاصله از این تحقیقات، با توالی ثبت شده در بانک جهانی ژن با استفاده از بلاست انجام شد. توالی COI ثبت شده برای گونه *C. nudus* در بانک جهانی ژن ۵۹۵ جفت باز است، بنابراین دقیقاً قطعه ۵۹۵ جفت بازی توالی COI گونه‌های *C. nudus* از بانک جهانی ژن (NCBI) استخراج و جهت مقایسه مورد استفاده قرار گرفتند. در شکل ۵، توالی‌های در نظر گرفته شده برای مقایسه از هر نمونه نشان داده شده است.

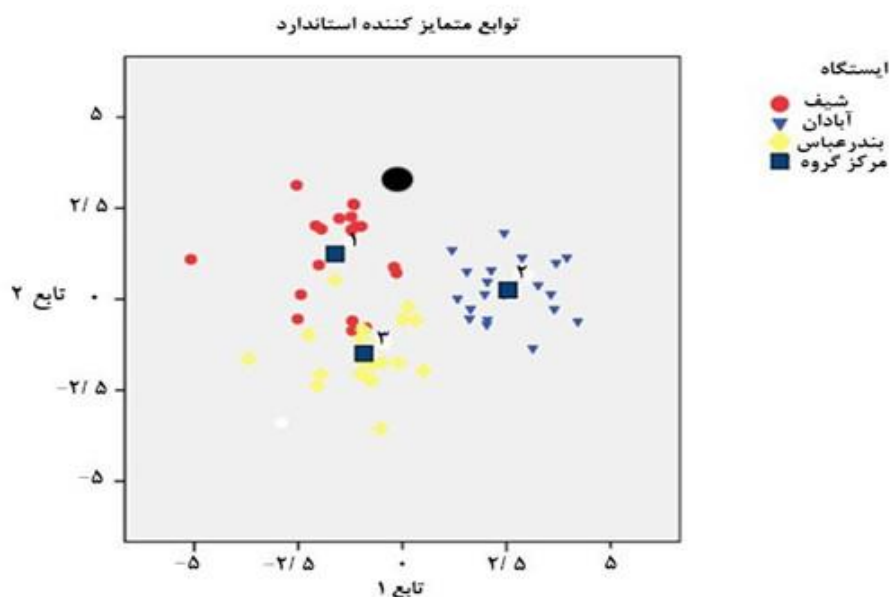
ترسیم درخت فیلوژنتیک بر اساس تجزیه و تحلیل‌های Maximum linkhood, Neighbor-joining, UPGMA و با شرایط پشتوانه تکرار ۱۰۰۰، حذف فاصله‌ها، در نظر گرفتن الگوی هموزن بین افراد، برای گونه *C. nudus* در مکان‌های نمونه‌برداری و در مقایسه با خاروباله سفید در سایر نقاط بر

برای تعیین توالی دوطرفه با استفاده از BigDye terminator دستگاه ABI377 Sequencer مورد استفاده قرار گرفت (ارسال برای شرکت ماکروژن کره جنوبی). مقدار ۲۰ میکرولیتر محصول PCR استخراجی با کیفیت برای تعیین توالی، استفاده شد و نتایج به صورت کروماتوگرام به‌دست آمد. در صورت پایین بودن کیفیت کروماتوگرام، دوباره فرایند تعیین توالی تکرار می‌شود. توالی‌های به‌دست آمده پس از مشاهده با استفاده از نرم‌افزار Chromas 2.1 (Technelysium, Tewantin, Australia) در صورت نیاز اصلاح و مورد تایید قرار می‌گیرند. این توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW (Thompson et al., 1994) بررسی و در نرم‌افزار Bioedit 7.0.9 (Hall, 1994) هم‌ردیف‌سازی شدند و برای ترسیم درخت و تجزیه و تحلیل فاصله‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. برای ترسیم درخت فیلوژنتی این نتایج از روش Maximum Likelihood (Saitou et al., 1987) استفاده و برای اطمینان از محل قرارگیری شاخه‌ها از ضریب تکرار Bootstrap ۱۰۰۰ تکرار در نرم‌افزار Mega 6 (Kumar et al., 2004) استفاده شد.

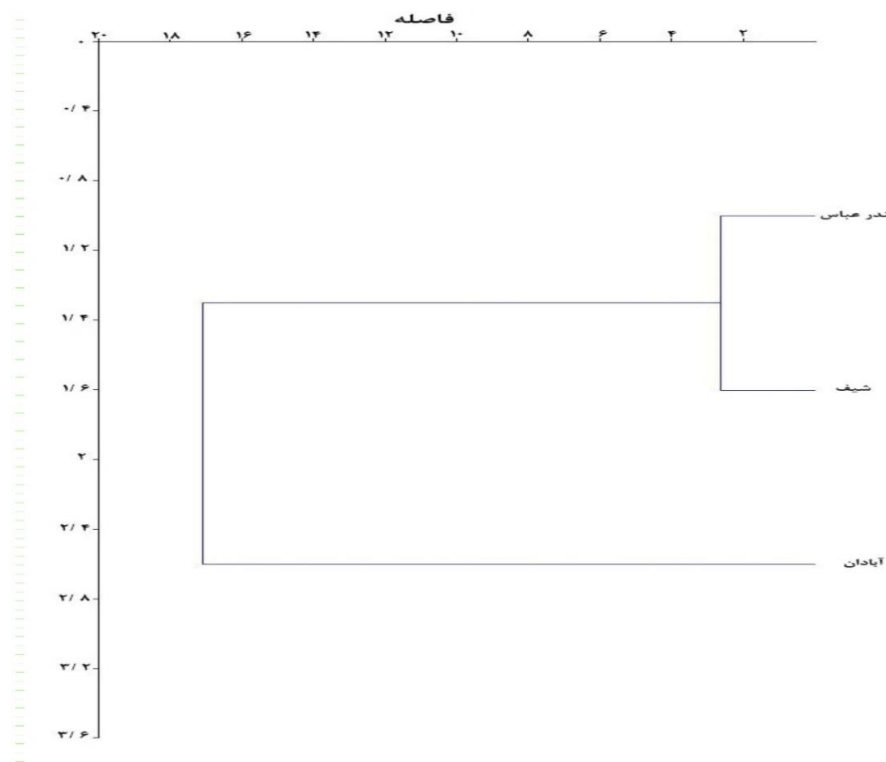
نتایج

پراکنش نقطه‌ای جمعیت‌ها بر اساس نمودار توابع متمایزکننده ۱ و ۲ نشان داده شد (شکل ۱). در مورد صفات ریخت‌سنجی تفکیک جمعیت‌ها واضح‌تر است. بر طبق نتایج، سه ایستگاه تا حد زیادی از هم جدا شدند، ایستگاه آبادان کاملاً از دو ایستگاه دیگر جدا شده بود و بین ایستگاه‌های شیف و بندرعباس، پوشانی وجود دارد. رسم دندروگرام UPGMA صفات ریخت‌سنجی بر اساس فاصله اقلیدسی نشان داد که سه جمعیت مورد مطالعه در ۳ کلاستر از یکدیگر متمایز گشته‌اند (شیف و بندرعباس در یک کلاستر و آبادان در یک کلاستر). نتایج نشان

اساس تفاوت به دست آمده از ژن COI رسم شد (شکل های ۵ الی ۹).



شکل ۲: نمودار حاصل از توابع متمایز کننده ۱ و ۲ در مورد ویژگی های ریخت سنجی در خاروماهیان مناطق: ۱-شیف ۲-آبادان و ۳-بندرعباس.



شکل ۳: خوشه صفات ریخت سنجی بر اساس فاصله اقلیدسی در خاروماهیان مناطق: ۱-آبادان، ۲-شیف و ۳-بندرعباس

S1 (Abadan1)

GGTGCCTGGGCAGGGATAGTAGGCACAGCCCTGAGCCTACTCATCCGAGCCGAGCTAAGTCAACCGGGG
 GCCCTTCTTGGAGACGACCAGATCTACAACGTTATTGTTACTGCGCATGCTTTCGTAATGATTTTCTTTATG
 GTCATACCTATCCTTATCGGGGGATTTCGGAAATTGACTGGTCCCTTAATGATCGGAGCACCCGATATGGC
 CTTCCCCCGCATGAATAATATAAGTTTTTGACTTTTACCCCCCTCGTTTCTCTTGCTGCTGGCCTCATCTGC
 AGTCGAGGCCGGGGCGGGCACCGGGTGGACAGTCTACCCGCCCTATCCGGCAATCTGGCCCACGCGGG
 AGCTTCAGTGGATCTCACCATTTTCTCGCTCCACTTAGCAGGGGTCTCCTCTATTCTAGGGGCTATCAATTT
 TATTACTACAATCATCAACATAAAACCCCCGCTATCTCACAATACCAAACACCCCTCTTCGTCTGAGCTG
 TACTAGTCACCGCAGTACTACTCCTGCTCTCTCCCTGTTCTGGCGGCCGGAATTACAATACTGCTTACA
 GACCGAAACCTAAACACGACCTTTTTTCGACCCGGCTGGCGGAGGGGACCCGATCCTCTACCAACACCTG

S2 (Bandar abbas1)

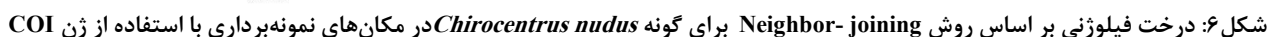
GGTGCCTGGGCAGGGATAGTAGGCACAGCCCTGAGCCTACTCATCCGAGCCGAGCTAAGTCAACCGGGG
 GCCCTTCTTGGAGACGACCAGATCTACAACGTTATTGTTACTGCGCATGCTTTCGTAATGATTTTCTTTATG
 GTCATACCTATCCTTATCGGGGGATTTCGGAAATTGACTGGTCCCTTAATGATCGGAGCACCCGATATGGC
 CTTCCCCCGCATGAATAATATAAGTTTTTGACTTTTACCCCCCTCGTTTCTCTTGCTGCTGGCCTCATCTGC
 AGTCGAGGCCGGGGCGGGCACCGGGTGGACAGTCTACCCGCCCTATCCGGCAATCTGGCCCACGCGGG
 AGCTTCAGTGGATCTCACCATTTTCTCGCTCCACTTAGCAGGGGTCTCCTCTATTCTAGGGGCTATCAATTT
 TATTACTACAATCATCAACATAAAACCCCCGCTATCTCACAATACCAAACACCCCTCTTCGTCTGAGCTG
 TACTAGTCACCGCAGTACTACTCCTGCTCTCTCCCTGTTCTGGCGGCCGGAATTACAATACTGCTTACA
 GACCGAAACCTAAACACGACCTTTTTTCGACCCGGCTGGCGGAGGGGACCCGATCCTCTACCAACACCTG

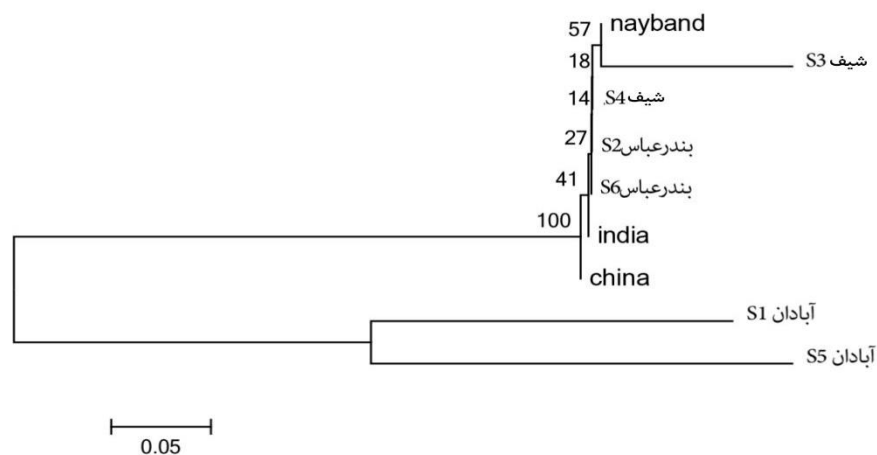
S3 (Shif1)

GGTGCCTGGGCAGGGATAGTAGGCACAGCCCTGAGCCTACTCATCCGAGCCGAGCTAAGTCAACCGGGG
 GCCCTTCTTGGAGACGACCAGATCTACAACGTTATTGTTACTGCGCATGCTTTCGTAATGATTTTCTTTATG
 GTCATACCTATCCTTATCGGGGGATTTCGGAAATTGACTGGTCCCTTAATGATCGGAGCACCCGATATGGC
 CTTCCCCCGCATGAATAATATAAGTTTTTGACTTTTACCCCCCTCGTTTCTCTTGCTGCTGGCCTCATCTGC
 AGTCGAGGCCGGGGCGGGCACCGGGTGGACAGTCTACCCGCCCTATCCGGCAATCTGGCCCACGCGGG
 AGCTTCAGTGGATCTCACCATTTTCTCGCTCCACTTAGCAGGGGTCTCCTCTATTCTAGGGGCTATCAATTT
 TATTACTACAATCATCAACATAAAACCCCCGCTATCTCACAATACCAAACACCCCTCTTCGTCTGAGCTG
 TACTAGTCACCGCAGTACTACTCCTGCTCTCTCCCTGTTCTGGCGGCCGGAATTACAATACTGCTTACA
 GACCGAAACCTAAACACGACCTTTTTTCGACCCGGCTGGCGGAGGGGACCCGATCCTCTACCAACACCTG

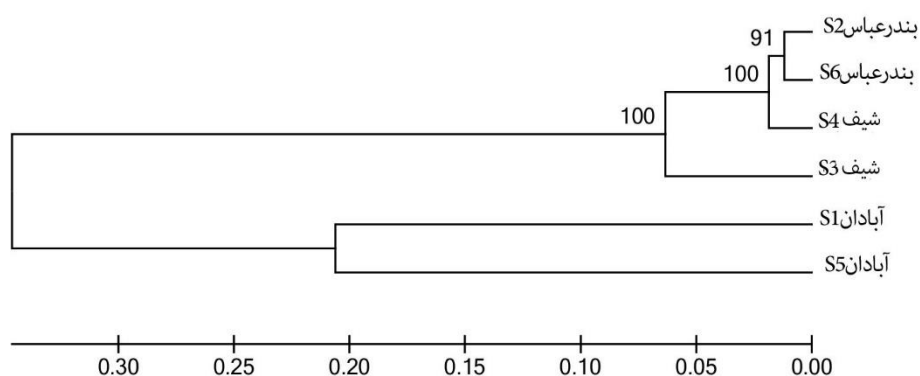
شکل ۴: توالی های کامل ژن COI سه نمونه از کل نمونه های مورد مطالعه که با استفاده از پرایمرها تعیین توالی شده اند.

شکل ۵: قطعه‌ای از توالی‌های ژن COI مورد استفاده تعدادی از گونه خارو باله سفید در سایر نقاط جهان

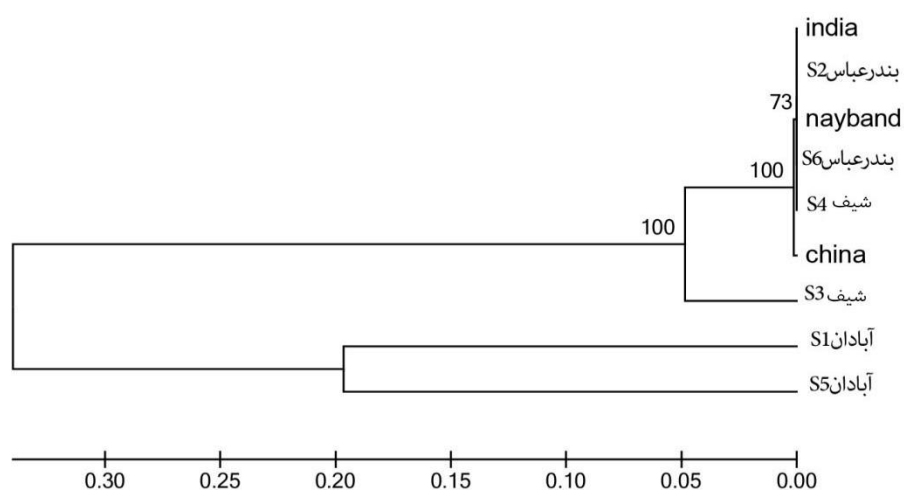




شکل ۷: درخت فیلوژنی بر اساس روش Neighbor-joining برای گونه *Chirocentrus nudus* در مکان‌های نمونه‌برداری و سایر نقاط دنیا با استفاده از ژن COI



شکل ۸: درخت فیلوژنی بر اساس روش UPGMA برای گونه *Chirocentrus nudus* با استفاده در مکان‌های نمونه‌برداری از ژن COI



شکل ۹: درخت فیلوژنی بر اساس روش UPGMA برای گونه *Chirocentrus nudus* با استفاده در مکان‌های نمونه‌برداری و سایر نقاط دنیا از ژن COI

بحث

شناسایی تغییرات درون گونه‌ای، تعیین ساختار جمعیت و امکان تفکیک جمعیت‌ها یکی از نیازهای اساسی در اعمال مدیریت صحیح و بهره‌برداری منابع شیلاتی است. نخستین گام در تدوین استراتژی مدیریت صحیح ذخایر آبزیان منابع آبی، شناسایی ذخایر ژنتیکی گونه‌ها است. تشخیص و تفکیک گونه‌ها، جمعیت‌ها یا نژادها و اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی در جمعیت ماهیان برای حفظ و مدیریت گونه‌های در معرض بهره‌برداری و صید بی‌رویه نیز ضروری است. بنابراین، لازم است تنوع ژنتیکی همواره مورد ارزیابی دقیق و پایش مستمر قرار گیرد.

تجزیه و تحلیل‌های مستقیم DNA براساس توالی نوکلوتیدهای آن کاربرد زیادی در مطالعه ماهیان از جمله تخمین شاخص‌های زیست‌شناسی دارد (تخمین شاخص‌های زیست‌شناختی (زمان تخم‌ریزی و مهاجرت ماهیان، معین نمودن ذخایر و ساختار جمعیتی و مطالعه روابط خویشاوندی) (Willsin *et al.*, 2000). امروزه تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از شاخص‌های مهم وضعیت اکولوژیک اکوسیستم‌های آبی است که به عنوان ابزار منحصربه‌فرد و توانمندی برای ارزیابی و مدیریت جوامع زیستی مطرح است (Avisé, 2000). تنوع ژنتیکی یکی از سه سطح تنوع زیستی پیشنهادی از سازمان حفاظت جهانی برای برنامه حفظ ذخایر است (Lucentini *et al.*, 2009).

با پیشرفت علوم کاربردی همچون ژنتیک در زمینه ملکولی، شناسایی جمعیت‌های متنوع با نژادهای اجتماعی متفاوت آسان‌تر شده است. در زمینه ملکولی روش‌های مربوط به آن، رهیافت‌های مختلفی ارائه شده که به‌واسطه آن‌ها مدیریت و شناسایی جمعیت‌های نادر ژنتیکی فراهم گردیده است. هدف اصلی بسیاری از آزمایش‌های ژنتیک ملکولی در آبزیان، تجزیه و تحلیل ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی، ارتباطات گونه‌ای، سیستماتیک و طبقه‌بندی آن‌ها می‌باشد (Rezvani, Gilkolaei, 1997; Lu, 1998). از جمله روش‌های ملکولی در تعیین تفاوت‌های نوکلوتیدی و پلی‌مورفیسم در بین جمعیت‌ها روش DNA Barcoding است. پلی‌مورفیسم ژنوم میتوکندری و هسته به عنوان شاخص‌های ژنتیکی ارزشمند در ارزیابی ژنوم و ساختار جمعیتی و حفاظت از ذخایر ژنی گونه‌های مورد مطالعه است (Omir *et al.*, 2020).

Hebert و همکاران (۲۰۰۳) بخش انتهایی 5' از ژن Cox1 میتوکندری را به عنوان منطقه DNA Barcoding استاندارد

برای چند یاخته‌ای‌ها پیشنهاد کردند. آن‌ها اظهار کردند، این منطقه با وضوح کامل طبقه‌بندی را تضمین نمی‌کند، اما نتایجی نزدیک به واقعیت را نشان می‌دهد. در حال حاضر، این منطقه برای بارکد جهانی موجودات پریاخته‌ای در نظر گرفته می‌شود و به تشخیص بهتر گونه‌ها کمک می‌کند. Hoolihin و همکاران (۲۰۰۶) به‌وسیله نشانگر mtDNA نشان دادند که واگرایی بسیار کمی در بین *Scomberomorus commerson* منطقه راپمی وجود دارد و پیشنهاد کردند که اختلاط در بین جمعیت‌های منطقه راپمی وجود دارد.

هاشم زاده سقرلو و همکاران (۱۳۹۳) به بررسی جمعیت ماهی قزل‌آلای خال قرمز (*Salmo trutta*) در رودخانه کرج پرداختند که در این تحقیق با توجه به شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده برای هاپلوتایپ‌های مختلف، مشخص شد که جمعیت ماهیان کرج از جمعیت ماهیان بومی ایران بوده و منشأ آن‌ها از حوضه خزر است که می‌تواند از هاپلوتایپ‌های اجدادی حوضه خزر امروزی باشد. بر اساس نتایج این تحقیق، نظریات مرتبط با منشأ مدیریتانه‌ای یا غیر بومی بودن این جمعیت رد شد.

اوجی فرد و همکاران (۱۳۹۷) با بررسی ژنتیکی شوورت ماهی نقره‌ای (*Sillago sihama*) در آبهای بوشهر و هرمزگان بر پایه تعیین توالی ژن CO1 نشان دادند که فاصله ژنتیکی کلی بین نمونه‌های دو ناحیه مذکور بر اساس Kimura 2-parameter، با استفاده از نرم افزار مگا ۰/۰۲ محاسبه گردید. همچنین با توجه به نتایج، نمونه‌های مورد بررسی دارای تبادل ژنی بالا بودند و تمایز بالایی بین دو استان هرمزگان و بوشهر وجود نداشت. بنابراین اعلام کردند که برای گونه شوورت ماهی نقره‌ای نمی‌توان دو جمعیت مجزا را بر اساس داده‌های این بررسی در نظر گرفت.

مطالعه حاضر، اولین مطالعه بر ساختار ژنتیکی ماهی خارو باله سفید *C. nudus* با استفاده از روش DNA Barcoding در خلیج فارس است. نتایج فیلوژنی نشان داد که شباهت ژنتیکی ماهیان خارو باله سفید مناطق بوشهر و بندرعباس به یکدیگر بیشتر است؛ به‌طوری‌که در یک گروه قرار گرفته و خارو باله سفید منطقه آبادان نیز در گروه جداگانه‌ای قرار می‌گیرد.

براساس نتایج نتایج، ۱۲ ویژگی ریخت‌سنجی در بین نمونه‌ها در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری داشت که نشان‌دهنده تنوع ریختی در ماهیان خاروباله سفید سه منطقه مورد بررسی است. در مورد داده‌های ریخت‌سنجی از آنالیزهای تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA)، تابع متمایز کننده (DFA) و رسم دندروگرام،

- Canadian Museum of Nature. Ottawa. Canada, Ottawa. 214P.
- Costa, A.C.P., Garcia, T.M., Tavares, T.C.L., dos Santos Rocha, R., Maggioni, R. and Soares, M.O., 2023.** DNA barcoding reveals cryptic diversity of fish eggs in Equatorial Southwestern Atlantic. *Regional Studies in Marine Science*, 65, 103069. DOI:10.1016/j.rsma.2023.103069.
- Halasan, L.C. and Lin, H.C., 2022.** Integrated morphometrics reveals conservatism in the cryptic yellowstripe scad (Perciformes: Carangidae) lineages from the Tropical Western Pacific. *Zoologischer Anzeiger*, 300:82-91. DOI:10.1016/j.jcz.2022.08.002.
- Hall, B.G., 1994.** Phylogenetic trees made easy: A how-to manual. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Haseli, M., Malek, M., Valinasab, T. and Palm, H.W., 2011.** Trypanorhynch cestodes of teleost fish from the Persian Gulf, Iran. *Journal of Helminthology*, 85(2):215-224. DOI:10.1017/S0022149X10000519.
- Hashemzadeh Saqrlou, Iraj and Farahmand, Hamid and Abdoli, Asghar, 2013.** Karaj red spotted trout population, 1758 survivors of ancestral populations, *Salmo trutta* L., 7th Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran, Tehran, <https://civilica.com/doc/375610>
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. and deWaard, J.R., 2003.** Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*, 270, S96–S99.
- Hoolihan, j.p., Anandh,p.j. and Herwarden ,I.v.2006.** mitochondrial analyses of narrow – barred Spanish mackerel suggestsna sing le
- استفاده گردید. نتایج آنالیز DFA در مورد صفات ریخت‌سنجی نشان داد که جمعیت خاروماهیان مناطق آبادان، شیف و بندرعباس به میزان ۹۱/۷ درصد از یکدیگرانشقاق یافته‌اند. نتایج آنالیز PCA برای صفات ریخت‌سنجی نشان می‌داد که تعداد ۹ عامل با مقادیر ویژه بزرگ‌تر از ۱ انتخاب شدند که شامل ۸۴/۵۶ درصد تنوع صفات ریخت‌سنجی است. بر اساس آزمون کروسکال والیس، از بین ۵ صفت شمارشی اندازه‌گیری شده، دو صفت شامل تعداد خارها و شعاع‌های باله پشتی و تعداد شعاع‌های نرم باله سینه‌ای، در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($P \leq 0.05$). نمودار پراکنش بر اساس مؤلفه‌های اول و دوم، دندروگرام صفات ریخت‌سنجی و شمارشی نشان داد که حداقل دو جمعیت مختلف (کلاستر یک شامل ماهیان شیف و بندرعباس و کلاستر دوم شامل ماهیان آبادان)، از گونه ماهی خارو باله سفید در خلیج فارس وجود دارد.
- هر دو مطالعه ژنتیکی و زیست‌سنجی ماهی خارو باله سفید نشان دادند که دو جمعیت از این گونه در سواحل ایرانی خلیج فارس وجود دارد که بیانگر این واقعیت است که جمعیت‌های به‌هم پیوسته از نظر جغرافیایی، شباهت ژنتیکی و ریختی بیشتر و جمعیت‌های با فاصله جغرافیایی بیشتر با جریان ژنی کم، فاصله ژنتیکی و ریختی بیشتری دارند.

تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد بوشهر و تمام افرادی که در مراحل اجرای پژوهش حاضر، همکاری و مساعدت نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- Avisé, J.C., 2000.** Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, 2000 M01 3 – 447P.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A. and Wilson, A.C., 1982.** Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of molecular evolution*, 18, 225-239.
- Coad, B.W., 1992.** Fishes of the Persian Gulf and Sea of Oman. Check list and bibliography.

- genetic stock in the ROPME sea area. ICES J. Mar. Sci. 63:1066 – 1074.
- Khedkar, D.G., Jamdade, R., Naik, S., Lior, D. and Haymer, D., 2014.** DNA Barcodes for the Fishes of the Narmada, One of India's Longest Rivers. PLoS One. 9(7): e101460. DOI:10.1371/journal.pone.0101460.
- Khomdram, B.D., 2018.** A small leap toward DNA barcode library creation of ornamental fishes: development of 17 DNA barcodes from Manipur, India. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, 11(3):452-458. DOI:10.1016/j.japb.2018.06.005.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M., 2004.** MEGA3: an integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 5:150–163.
- Lucentini, L., Palomba, A., Lancioni, H., Gigliarelli, L., Sgaravizzi, G., Natali, M. and Panara, F., 2009.** Temporal changes and effective population size of an Italian isolated and supportive-breeding managed northern pike (*Esox Lucius*) population. *Fisheries Research*, 96:139-147.
- Lu, C.C. 1998.** Diversity of Cephalopoda from the waters around Taiwan. Phuket Marine Biological Center Special Publication. 18(2):331-340.
- Luther, G., 1966.** On the little-known fish, *Chirocentrus nudus* Swainson from the Indian Seas, and its comparison with *Chirocentrus dorab* (Forsk.) *Journal of the Marine Biological Association of India*, 8(1):193-201.
- Mathew, S., Ammu, K., Nair, P.V. and Devadasan, K., 1999.** Cholesterol content of Indian fish and shellfish. *Food Chemistry*, 66(4):455-461. DOI:10.1016/S0308-8146(99)00050-3.
- Mccusker, M.R., Denti, D., Van Guelpen, L., Kenchington, E. and Bentzen, P., 2013.** *Molecular Ecology Resource*, 13(2), 177-188.
- Nahavandi, R., Tamandani Jahormi, S. and Bayati, F., 2021.** Study of genetic diversity and DNA barcoding of two species, (*Rachycentron canadum*) and (*Parastromateus niger*) in the Persian Gulf. *Journal of Marine Biology*, 13 (3): 29-40.[in Persian]
- Oji Fard, A., Shadi, A., Fateh, A. and Hosseini, S.J., 2017.** Genetic investigation of the silver fish *Sillago sihama* in the Northern waters of the Persian Gulf based on the sequence of the cytochrome oxidase C subunit I gene, *Journal of Marine Science and Technology*, 17(3), 22-13. DOI: 10.22113/jmst.2017.44309
- Omair, 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.
- Ovenden, J.R., Brasher, D.J. and White, R.W.G., 1992.** Mitochondrial DNA analyses of the red rock lobster *Jasus edwardsii* supports an apparent absence of population subdivision throughout Australasia. *Marine biology*, 112, pp.319-326.
- Pourmozaffar, S., Tamdani Jahormi, S., Ghazi, M., Foroghi Fard, H. and Ameez, R., 2019.** Molecular and DNA barcoding of the striped tailed groundfish (*Platycephalus indicus*) in the Persian Gulf coast. *Scientific Journal of Applied Fisheries Research*. 1399; 8 (3): 19-26. DOI: 10.22034/jair.8.3.19

- Rezvani Gilkolaei, S., 1997.** Molecular population genetic studies of sturgeon species in the south Caspian Sea. Ph.D. Thesis. School of biological sciences, university of Wales, Swansea, U.K. 196P.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987.** The Neighbor-Joining method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- Siddeek, M.S.M., Fouda, M.M. and Hermosa Jr, G.V., 1999.** Demersal fisheries of the Arabian Sea, the Gulf of Oman and the Arabian Gulf. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 49, pp. 87-97.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T. J., 1994.** ClustalW—improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673–4680.
- Tizkar, B., Seidavi, A. and Ponce-Palafox, J.T., 2020.** Study of some morphometric, meristic characters and length-weight relationship in wild and domestic populations of the eastern river prawn, *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae), in Iranian Basin of the Caspian Sea. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(4), 2173-2184. DOI:10.22092/ijfs.2018.117176.
- Wang, Y., Ma, C., Song, X., Li, M. and Zhang, H., 2024.** Assessment of fish diversity in the East China Sea hairtail national aquatic germplasm resources conservation zone using DNA barcoding. *Global Ecology and Conservation*, e03013P. DOI:10.1016/j.gecco.2024.e03013
- Wilson, K., Cahill, V., Ballment, E. and Benzie, J., 2000.** The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: are malacostracan crustaceans more closely related to insects than to branchiopods. *Molecular Biology and Evolution*, 863-874.

The study of the population structure of the white fin fish *Chirocentrus nudus* (Swinson, 1839) in the coasts of the Persian Gulf with morphometry and DNA barcoding methods

Fekrandish H.^{1*}

*hfekrandish@yahoo.com

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

Abstract

In order to study the genetic structure and morphology of the population of the whitefin wolf herring (*Chirocentrus nudus*) from three regions of Abadan, Shif and Bandar Abbas on the coast of the Persian Gulf, 20 specimens from each station and a total of 60 fish were collected using gill-nets in May 2019. 29 morphometric and 5 counting traits were measured. For genetic study using mitochondrial cytochrome oxidase (COI) gene sequencing method, a piece of caudal fin of 6 fish samples from Shif, Abadan and Bandar Abbas stations were fixed in 96% ethanol and transferred to the laboratory. DNA extraction was done by phenol chloroform and polymerase chain reaction with a pair of primers. After sequencing or COI gene barcode, the sequences were aligned. The results of sequencing showed that the amplified fragment is exactly 595 bp. The COI gene in the region studied is exactly the same in all samples. Also, the results of principal component analysis (PCA) for morphometric traits showed that 9 factors with eigenvalues greater than 1 were selected, which includes 84.56% of the variation of morphometric traits. The distribution diagram based on the first and second components, dendrogram of morphometric traits and phylogeny tree drawing with Maximum likelihood, Neighbor-joining and UPGMA software showed that the whitefin wolf herring has at least two populations in the north of the Persian Gulf.

Keywords: Whitefin wolf herring, Morphometry, Sequencing, COI gene barcode