



بررسی تنوع ژنتیکی شش گونه از ماهیان اقتصادی در منطقه خلیج فارس با استفاده از ژنوم 16SrRNA

رضا نهاوندی^{۱*}، سعید تمدنی جهرمی^۲

*Rezanahavandi91@gmail.com

۱- موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۳

چکیده

کاهش ذخایر آبزیان در نقاط مختلف جهان موجب شده است که پژوهشگران علوم شیلاتی پیش از هر گونه اقدام عملی در راستای مدیریت ذخایر آبزیان اقتصادی، ماهیان زینتی و ماهیان جنگل‌های مانگرو، به بررسی و تعیین ساختار ژنتیکی گونه‌های با ارزش آن منطقه از طریق روش‌های مولکولی بپردازند. بنابراین، شناخت ساختار ژنتیکی گونه‌های مختلف اقتصادی خلیج فارس از جمله شش گونه مذکور، پیش از هر گونه اقدام عملی برای حفظ و افزایش این ذخایر ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش، نواحی خاصی از ژنوم میتوکندریایی (mtDNA) به نام 16SrDNA با موفقیت تکثیر و تعیین توالی شد. در این فرآیند، حدود ۶۵۰-۶۰۰ جفت باز آمپلی فای شده و بازهای قابل اعتماد از هر ژن برای بررسی فایلوژنی انتخاب گردیدند. نمونه‌برداری از مناطق هدف که شامل اصلی‌ترین زیستگاه‌های منحصربه‌فرد شش گونه مورد مطالعه در خلیج فارس است، انجام شد. این گونه‌ها شامل راشگو معمولی (*Eleutheronema tetradactylum*)، صیبتی (*Sparidentex hasta*)، سنگسر معمولی (*Pomadasy kaakan*)، شوریده (*Otolithes ruber*)، میش ماهی منقوط (*Protonibea diacanthus*) و حلوا سفید (*Pampus argenteus*) می‌باشند. این گونه‌ها از مهم‌ترین موجودات دریایی در این منطقه شناخته می‌شوند و نمونه‌برداری در زیستگاه‌های طبیعی آنها صورت گرفت. طبق روش استاندارد، از هر نمونه حداقل پنج قطعه از باله شنای گونه‌های مورد مطالعه برای انجام تحلیل‌های مولکولی و شناسایی دقیق گونه‌ها جدا شد. در این تحقیق، گونه راشگو (*Eleutheronema tetradactylum*) به عنوان یک هاپلوتاایپ مجزا در کنار نمونه‌هایی از مالزی و چین در کلاید سوم به همراه نمونه‌ای از میش ماهیان شناسایی گردید. همچنین نمونه‌ای از میش ماهی غالب (*Protonibea diacanthus*) در منطقه خوزستان در مقایسه با نمونه‌ای از میش ماهی معمولی (*Argyrosomus hololepidotus*) در استان هرمزگان مشاهده شد که نشان‌دهنده غالب بودن گونه منقوط در غرب خلیج فارس نسبت به گونه میش ماهی معمولی (*Argyrosomus hololepidotus*) در شرق خلیج فارس است. اگر این فرضیه به اثبات برسد، می‌توان این گونه را به عنوان یک گونه یا مورفوتاایپ جدید و اندمیک منطقه خلیج فارس مورد بررسی قرار داد. این گونه به همراه ماهی شوریده، در قالب کلاستر خاوه‌ری با اختلاف یازده درصدی، به همراه نمونه‌هایی از کشور هند، کلاید دوم را کامل می‌کند. ماهی سنگسر معمولی با اختلاف بالاتری نسبت به پنج گونه مذکور دیگر، در کلاید اول قرار گرفت و اختلافی در بین نمونه‌های این گونه از هرمزگان و خوزستان مشاهده نشد. اما این گونه با نمونه‌ای از چین اختلاف نه درصدی را نشان داد که نمایانگر عدم مهاجرت و کاهش انتقال آلل‌های بین جمعیتی است. اگرچه این گونه با گونه حلوا سفید در همین کلاید با اختلاف دوازده درصدی و با گونه صیبتی با اختلاف چهارده درصدی کلاستر خاوه‌ری را نشان داد. این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده از توالی 16SrDNA می‌تواند اطلاعات ارزشمندی درباره ساختار جمعیتی ماهیان، روابط ژنتیکی بین گونه‌ها در منطقه خلیج فارس و وضعیت اکولوژیک این منابع فراهم کند. همچنین این یافته‌ها می‌توانند به مدیریت بهتر منابع آبی و حفظ تنوع زیستی و برنامه‌ریزی‌های مدیریتی و حفاظتی کمک کنند.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، خلیج فارس، PCR، 16SrDNA، mtDNA

مقدمه

از رایج‌ترین روش‌ها برای پاسخگویی به سوالات مربوط به طبقه‌بندی، شناسایی گونه‌ها و ژنتیک جمعیت ماهیان از جمله ماهیان زینتی است. مطالعه حاضر با استفاده از توالی ژنوم 16S rRNA به بررسی ارتباط فاصله ژنتیکی بین شش گونه از ماهیان اقتصادی خلیج فارس با یکدیگر و نیز دیگر نقاط گزارش شده از سایر نقاط دنیا پرداخته است. همچنین این تحقیق به مدیریت بهره‌برداری بهینه از گونه‌های بومی، حفظ تنوع زیستی و نیز حفاظت پایدار از این گونه‌ها کمک خواهد کرد.

مواد و روش‌ها

روش نمونه‌برداری

نمونه‌برداری‌ها از مناطق هدف و مورد نظر که اصلی‌ترین و مهم‌ترین زیستگاه‌های منحصربه‌فرد شش گونه مورد نظر در این پروژه در ایران است، انجام گرفت. از هر نمونه، طبق روش استاندارد، حداقل پنج قطعه از باله شئی گونه‌های مورد مطالعه (Zhang and Hanne, 2011) جهت انجام کار مولکولی برداشته شد. سپس در الکل اتیلیک خالص نگهداری گردید و در نهایت جهت انجام آزمایش‌های مولکولی، به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان منتقل شدند. در این پژوهش، استخراج DNA به روش فنل - کلروفورم به ترتیب ذیل انجام گردید (Taggart *et al.*, 1990). جهت تکثیر بخشی از ژن 16S از پرایمرهای 16Sar و 16Sbr (Simon *et al.*, 1991) $5' - \text{gcctgtttaacaaaacat} 16\text{SarR } 5'$ و $3' - \text{ccggtctgaactcagatcatgt} - 3'$ بدین صورت که درون هر یک از تیوب‌های حاوی ۱ میکرولیتر از جفت آغازگرهای اختصاصی ماهی یال اسبی سر بزرگ که طراحی شده بود (۳۰ پیکومول، ۱۰۰ نانوگرم DNA استخراجی، ۰/۲ میکرولیتر Taq (۵۰/۵)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (X1۰)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار) و ۰/۸ میکرولیتر MgCl_2 (۵۰ میلی مولار) افزوده شد و در نهایت حجم هر تیوب، با افزودن آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس تیوب‌ها به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفوژ شده و در ترموسایکلر قرار گرفتند. چرخه حرارتی مورد استفاده در دستگاه PCR عبارت بود از: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و در پی آن، ۳۰ چرخه شامل دماهای واسرشته سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال ۴۵ ثانیه در

استفاده از آبریان دریایی به عنوان یکی از منابع تأمین نیازهای پروتئینی در بسیاری از کشورهای جهان، سابقه‌ای طولانی دارد. با این حال، در سال‌های اخیر، افزایش تقاضا و صید بی‌رویه، ذخایر آبریان را با خطرات جدی مواجه کرده است. برای مقابله با این چالش‌ها، نهادهای مرتبط به بررسی داده‌های ارزیابی ذخایر پرداخته و مدل‌هایی برای مدیریت صید و بهره‌وری پایدار آبریان ارائه می‌دهند (Tavakoli- Kolour, 2022). آگاهی و بررسی مداوم وضعیت ژنتیکی آبریان برای حفظ ذخایر آبریان و ماهیان زینتی و مدیریت گونه‌هایی که در معرض بهره‌برداری و صید بی‌رویه قرار دارند، امری ضروری است (Azahar *et al.*, 2022). شناسایی و تعیین حدود گونه‌ها در زمینه‌های زیست‌شناسی، جغرافیای

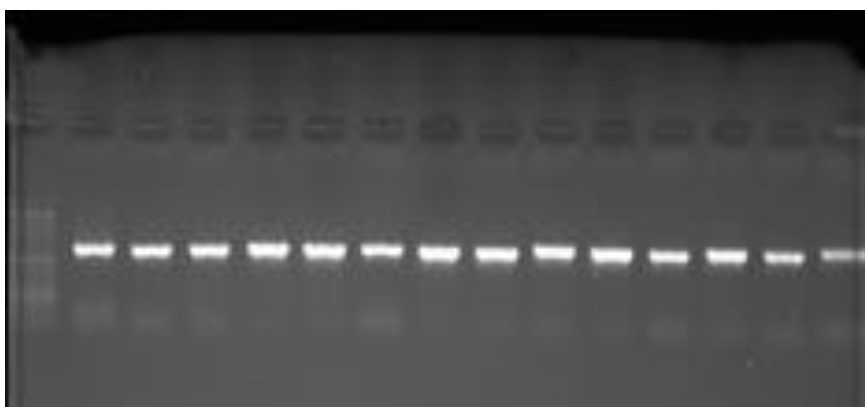
زیستی، بوم‌شناسی و حفاظت اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا گونه‌ها واحدهای اساسی برای کمی‌سازی و مدیریت تنوع زیستی به‌شمار می‌روند. از لحاظ تاریخی، شناسایی و تعیین حدود گونه‌ها توسط طبقه‌شناسان با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی انجام گردیده است (Mer Mosharraf Hossain *et al.*, 2022). این فرآیندها نیازمند تخصص بالایی بوده و زمان‌بر هستند. با این حال، بسیاری از گروه‌های متنوع از نظر ریخت‌شناسی هنوز ناشناخته مانده‌اند و شامل گونه‌های توصیف‌نشده‌ای هستند که طبقه‌بندی موجود در این زمینه متناقض است (Habib *et al.*, 2023). رویکردهای تحلیلی مولکولی، مانند بارک‌گذاری DNA برای شناسایی و تعیین حدود گونه‌های آبریان و ماهیان زینتی توسعه یافته‌اند و اکنون برای حل بسیاری از مشکلات طبقه‌بندی مرتبط با جانوران و گونه‌های گیاهی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند (Chen *et al.*, 2022). نشانگرهای مولکولی در دهه‌های اخیر ابزارهای قدرتمند و دقیقی را برای مطالعات فیلوژنی، فیلوژغرافیا و ژنتیک جمعیت در اختیار محققان قرار داده‌اند (Fadli *et al.*, 2023). برای بررسی فیلوژغرافیا و تنوع ژنتیکی ذخایر آبریان از نشانگرهای مختلف مولکولی نظیر توالی ژن‌های میتوکندریایی و میکروساتلایت‌ها استفاده می‌شود. توالی ژن‌های میتوکندریایی مانند زیرواحد یک سیتوکروم اکسیداز (COI) و توالی 16S rRNA به شناسایی تنوع‌های درون جمعیتی و بین جمعیتی کمک می‌کنند (Fitri *et al.*, 2024). استفاده از این ژن‌ها یکی

گردید که تنها ۵۰۰ باز از این ژن برای تطابق با نمونه‌های دریافتی از بانک ژن حفظ شدند. درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش حداکثر احتمال (ML) به طور جداگانه بازسازی شد و نتایج نشان داد که توالی‌ها در دو کلاد اصلی قرار دارند که هر یک دارای حمایت بالایی هستند. تجزیه و تحلیل ریخت‌شناسی درخت تکاملی با استفاده از روش Neighbor-Joining بر اساس فاصله Kimura 2-parameter، وجود سه شاخه اصلی را نشان می‌دهد که نمونه‌های گونه‌های سنگسر و حلوا سفید به همراه گونه صبیتی به عنوان گروه خواهری دیگر در یک کلاید قرار گرفتند (با اختلاف ژنتیکی ۰/۱۴-۰/۱۲ درصد). در کلاید دوم می‌ش ماهیان به همراه ماهی شوریده با اختلاف ژنتیکی ۱۷-۰/۱۳ درصدی بین این گونه و سه گونه مذکور قرار گرفتند و در کلاید آخر گونه راشگو به صورت یک هاپلوتایپ جداگانه به همراه می‌ش ماهی منقوط از خوزستان در کنار نمونه‌هایی از مالزی و چین در شاخه سوم قرار گرفت. نکته قابل توجه در این تحقیق، شناسایی می‌ش ماهی منقوط در منطقه خوزستان در مقایسه با نمونه‌ای از می‌ش ماهی معمولی در استان هرمزگان است. این یافته نشان‌دهنده شناسایی یک هاپلوتایپ جدید با اختلاف ژنتیکی قابل توجه از دیگر نمونه‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن است. همچنین بین نمونه‌های خلیج فارس و نمونه‌های هندی اختلاف چندانی مشاهده نشد که این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی محدود در این نواحی باشد (شکل‌های ۱ الی ۴، جداول ۱ و ۲).

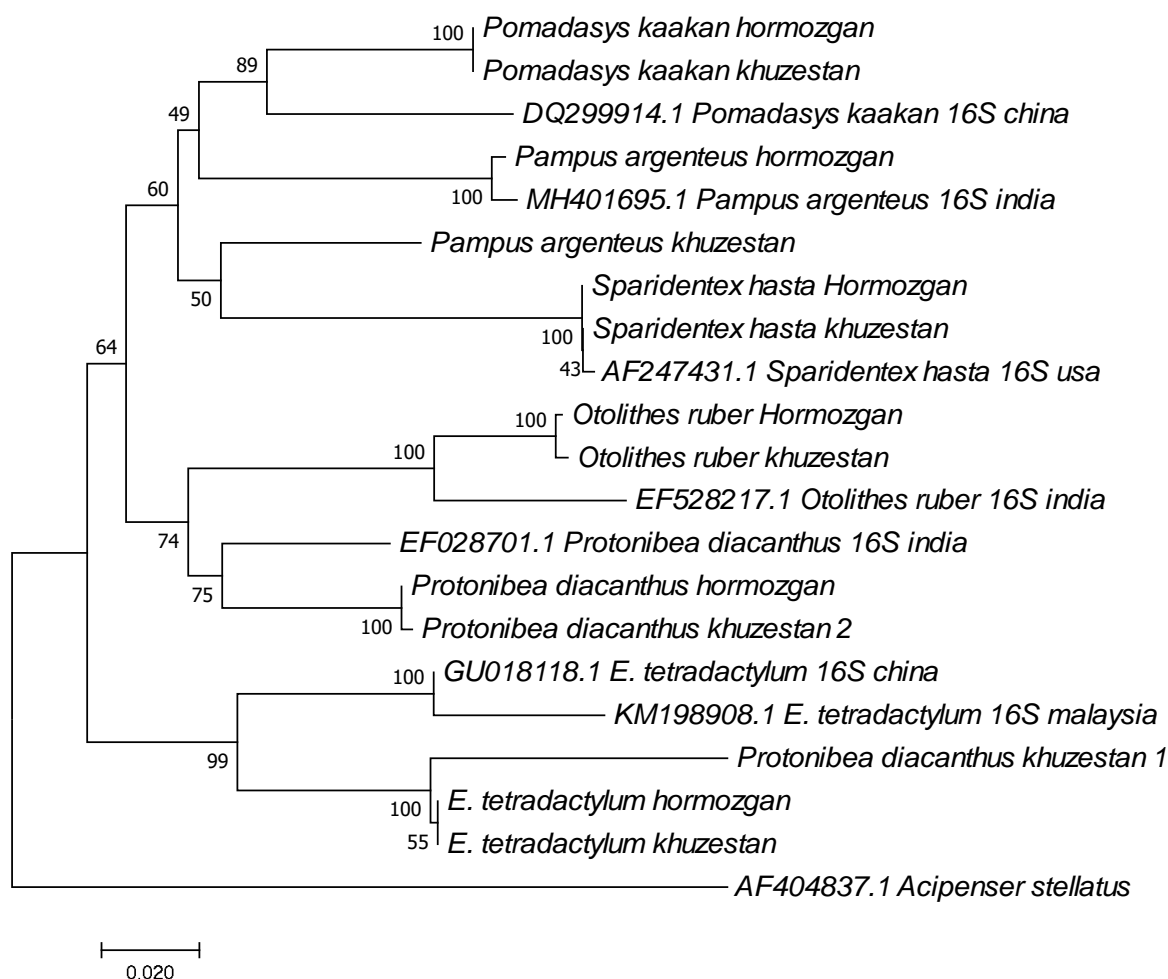
دماهای اختصاصی ۵۵ درجه سانتی‌گراد، بسط و تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه. در نهایت بسط و تکثیر نهایی به مدت ۵ دقیقه انجام گردید، محصول PCR استحصالی، به منظور بررسی وجود و سنجش کیفیت آن، با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. محصول PCR به دست آمده به فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. سپس ۱۵ نمونه محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت Biogene کره ارسال گردید و تعیین توالی با روش سانگر انجام گردید. جهت بررسی فیلوژنوفیایی توالی ژن مورد مطالعه از سایر مناطق از بانک ژن (NCBI) دریافت گردید. توالی‌های دریافتی با کمک نرم افزار ویرایش و سپس با کمک الگوریتم Clustal W تعبیه شده در نرم افزار BioEdit همدریف و به فرمت Nexus ذخیره شدند. جهت ترسیم درخت‌های فیلوژنوفیایی حداکثر احتمال (ML) از نرم افزار RaxML با ۱۰۰۰ تکرار کاذب (Bootstrap) و مدل تکاملی GTR+G استفاده شد. برای محاسبه فاصله ژنتیکی (K2P)، دو توالی از هر سه کلاد اصلی انتخاب و میانگین فاصله بین گروه‌ها با کمک نرم افزار Mega انجام شد.

نتایج

پس از استخراج DNA، انجام مراحل تکثیر و توالی‌یابی قطعات هدف و همچنین دریافت تعدادی از بانک ژن، توالی‌ها ویرایش و الاین شدند. ۱۵ توالی از ژن 16SrDNA در تحلیل‌ها انتخاب



شکل ۱: محصول PCR شش گونه از ماهیان مورد مطالعه



شکل ۲: درخت تکاملی ژن 16SrDNA شش گونه مورد مطالعه به روش Neighbor-Joining

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

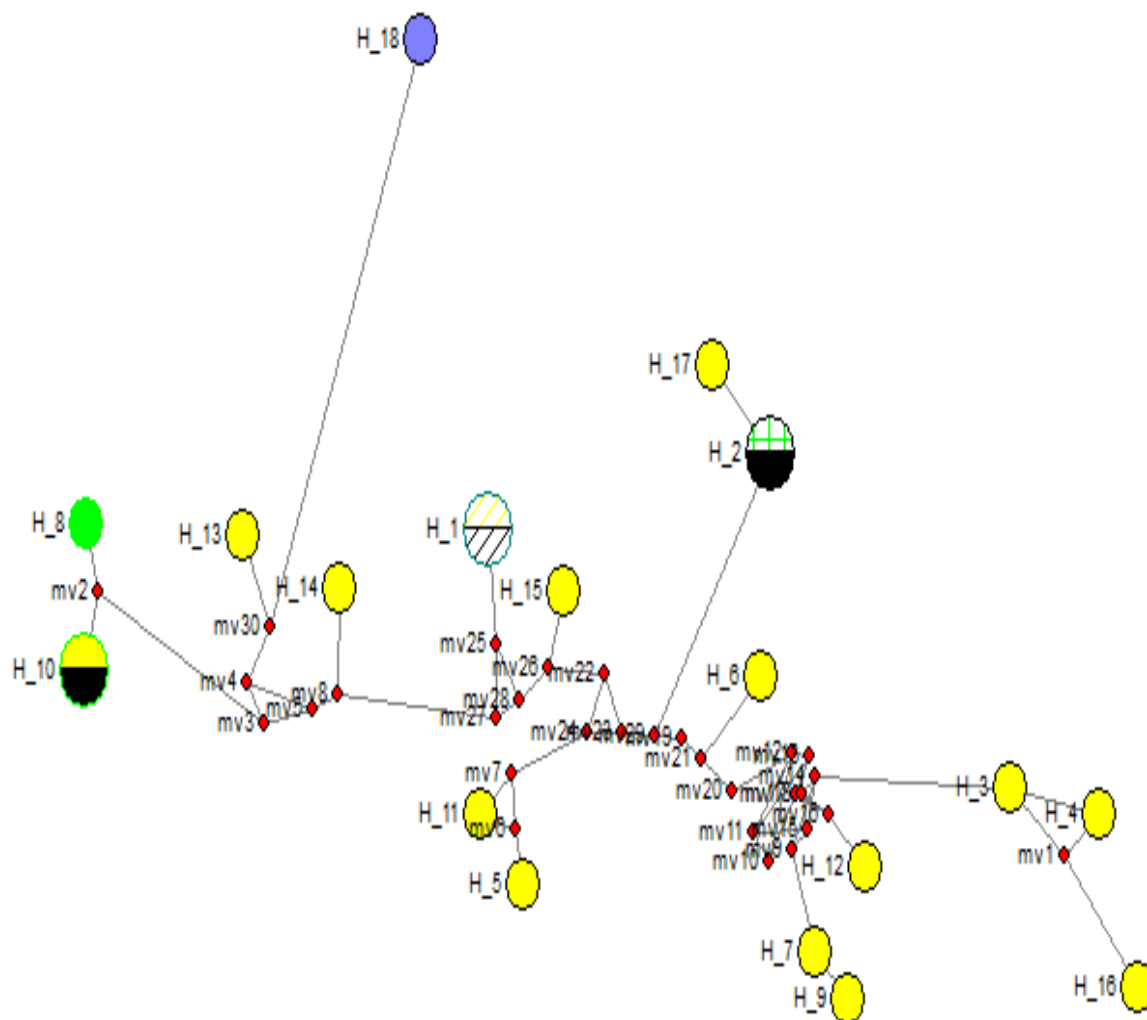
ردیف	نام ماهی	نام علمی ماهی	نام ژن	بانک جهانی ژن	کد دسترسی
۱	حلوا سفید	<i>Pampus argenteus</i>	16SrDNA	NCBI	MT111711.1
۲	راشگو معمولی	<i>Eleutheronema tetradactylum</i>	16SrDNA	NCBI	MT111714.1
۳	سنگسر معمولی	<i>Pomadasys kaakan</i>	16SrDNA	NCBI	MT111715.1
۴	میش ماهی منقوط	<i>Protonibea diacanthus</i>	16SrDNA	NCBI	MT111717.1
۵	شوریده	<i>Otolithes ruber</i>	16SrDNA	NCBI	MT111718.1

جدول ۲: درصد فاصله ژنتیکی ژن 16SrDNA شش گونه مورد مطالعه نسبت به یکدیگر و نسبت به گونه‌های گزارش شده

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1. Pomadasys kaakan hormozgan																						
۲. Pomadasys kaakan khuzestan	0.00																					
3. Sparidertex hasta Hormozgan	۰.۰۱	۰.۰۱																				
4. Sparidertex hasta khuzestan	۰.۰۱	۰.۰۱	0.00																			
5. Otolithes ruber Hormozgan	0.16	0.16	0.18	0.18																		
6. Otolithes ruber khuzestan	0.16	0.16	0.18	0.18	0.00																	
7. Pampus argenteus hormozg	0.12	0.12	0.16	0.16	0.17	0.17																
8. Pampus argenteus khuzestan	0.11	0.11	0.11	0.11	0.16	0.16	0.11															
9. Protonibea diacanthus hormozgan	۰.۰۱	۰.۰۱	0.11	0.11	0.15	0.15	0.13	0.12														
10. Protonibea diacanthus khuzestan 1	0.21	0.21	0.24	0.24	0.22	0.22	0.21	0.21	0.18													
11. Protonibea diacanthus khuzestan 2	۰.۰۱	۰.۰۱	0.15	0.15	0.11	0.11	0.13	0.12	0.00	0.19												
12. E. tetradactylum hormozgan	0.15	0.15	0.18	0.18	0.16	0.16	0.15	0.15	0.13	0.06	0.13											
13. E. tetradactylum khuzestan	0.15	0.15	0.18	0.18	0.16	0.16	0.15	0.15	0.13	0.06	0.13	0.00										
14. MH401695.1 Pampus argenteus 16s india	0.13	0.13	0.15	0.15	0.17	0.17	0.01	0.11	0.13	0.21	0.13	0.15	0.15									
15. EF028701.1 Protonibea diacanthus 16s india	0.13	0.13	0.12	0.12	0.12	0.12	0.13	0.10	0.07	0.20	0.07	0.13	0.13	0.14								
16. GU018118.1E. tetradactylum 16s china	0.12	0.12	0.18	0.18	0.15	0.15	0.16	0.13	0.14	0.15	0.14	0.09	0.09	0.17	0.13							
17. KM198908.1 E. tetradactylum 16s malaysia	0.15	0.15	0.23	0.23	0.21	0.21	0.19	0.17	0.19	0.15	0.20	0.12	0.12	0.20	0.17	0.03						
18. DQ299914.1 Pomadasys kaakan 16s china	0.09	0.09	0.15	0.15	0.17	0.17	0.12	0.12	0.13	0.23	0.13	0.16	0.16	0.12	0.14	0.15	0.18					
19. EF528217.1 Otolithes ruber 16s india	0.17	0.17	0.20	0.20	0.06	0.07	0.18	0.17	0.13	0.21	0.13	0.16	0.16	0.18	0.14	0.16	0.21	0.18				
20. AF247431.1 Sparidertex hasta 16s usa	0.15	0.15	0.00	0.00	0.18	0.18	0.16	0.12	0.15	0.24	0.15	0.18	0.18	0.15	0.12	0.18	0.23	0.15	0.21			
21. AF404837.1 Acipenser stellatus	0.23	0.23	0.25	0.25	0.26	0.26	0.25	0.24	0.23	0.30	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.21	0.27	0.26	0.26	0.25		



شکل ۳: همردیفی قسمتی از توالی‌های ژن 16SrDNA گونه‌های مختلف مورد مطالعه در این تحقیق نسبت به یکدیگر و نسبت به گونه‌های گزارش شده



شکل ۴: رسم درخت شبکه تنوع هاپلوتایپی با استفاده از ژنوم 16SrDNA متعلق به شش گونه مورد مطالعه، هاپلوتایپ شماره ۱۸ متعلق به ماهی خاویاری اوزون برون (*A. estellatus*) به عنوان out group

بحث

می‌توانند روابط فیلوژنی و ساختار ژنتیکی واقعی را بهتر نمایان سازند (Zhang *et al.*, 2023). در این تحقیق، بخشی از ژنوم mtDNA به نام 16SrDNA با موفقیت تکثیر و تعیین توالی گردید. حدود ۶۵۰ جفت باز تکثیر شده و ۵۶۰ جفت باز قابل اطمینان برای بررسی فیلوژنی انتخاب شد و توالی‌ها در بانک جهانی ژن (NCBI) ثبت شدند (جدول ۱ و شکل ۳). برای مطالعه ژنتیکی و تعیین فاصله ژنتیکی بین شش گونه مورد بررسی، از درخت فیلوژنی Neighbor-Joining استفاده شد (شکل ۲). نتایج نشان داد که گونه راشگو به عنوان یک هاپلوتایپ جداگانه در کنار نمونه‌هایی از مالزی و چین در کلاید

کاهش ذخایر آبزیان در بسیاری از نقاط جهان باعث گردیده است تا محققین علوم شیلاتی جهت مدیریت ذخایر آبزیان، قبل از هر اقدام عملی، به مطالعه و تعیین ساختار ژنتیکی گونه‌های با ارزش آن منطقه از طریق روش‌های مولکولی روی آورند که در برنامه‌های بهره‌برداری از ذخایر آبزیان دریایی، صنعت آبی‌پروری و برنامه‌های اصلاح‌نژادی، دارای اهمیت بالایی است (Panprommin *et al.*, 2023). در اکثر موجودات، برای تعیین روابط تکاملی، داده‌های مربوط به توالی DNA به کار می‌روند. این داده‌ها چون کمتر تحت تأثیر انتخاب طبیعی قرار می‌گیرند،

معمولی با اختلاف بالاتری نسبت به پنج گونه مذکور در کلاید اول قرار گرفت و اختلافی در بین نمونه های این گونه از هرمزگان و خوزستان مشاهده نشد، ولی این گونه با نمونه‌ای از چین اختلاف ۹ درصدی را نشان داد که نشان‌دهنده عدم مهاجرت و کاهش انتقال آلل‌های بین جمعیتی است (جدول ۲). اگرچه این گونه با گونه حلوا سفید در همین کلاید با اختلاف دوازده درصدی و نیز با گونه صبیته با اختلاف چهارده درصدی کلاستر خاوه‌ری را نشان می‌دهد. عوامل محیطی مانند وجود سدهای فیزیکی و گیاهی نیز می‌توانند بر تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت گونه‌های مختلف تأثیرگذار باشند. خوریات و جنگل‌های حرا به عنوان مناطق نوزادگاهی و تغذیه لارو ماهیان، تأثیر زیادی بر میزان تنوع ژنتیکی آبزیان دارند (Ram et al., 2020). در همین ارتباط این گونه از لحاظ تجاری در گرید A قرار می‌گیرد و به نسبت سایر گونه‌های مورد بررسی از میزان صید بالایی برخوردار است که این امر نیز می‌تواند در این مطالعه مورد توجه قرار گیرد. با این حال، اگر داده‌های به‌دست آمده، انعکاس واقعی از ترکیب ژنتیکی گونه‌های مورد نظر باشد، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ترکیب ژنی گونه‌های مورد بررسی و ارتباط فیلوژنی آنها، دور از انتظار نبود، ولی جداسازی هاپلوتایپ‌های مختلف از نمونه‌های شش گونه از ماهیان منطقه در مقایسه با نمونه‌های ثبت شده، بسیار قابل تامل است. تجزیه و تحلیل DNA میتوکندری نشان‌دهنده واگرایی ژنتیکی میان گونه‌های مختلف و شناسایی قرابت‌های ژنتیکی آنها در منطقه خلیج فارس است. این نوع تحلیل می‌تواند به عنوان ابزاری مهم برای انتخاب مولدین در برنامه‌های اصلاحی و بازسازی ذخایر آبزیان مورد استفاده قرار گیرد (Pinasti et al., 2021). اگر داده‌های به‌دست آمده نمایانگر واقعی ترکیب ژنتیکی گونه‌های مورد نظر باشند، ارتباط فیلوژنی آنها دور از انتظار نخواهد بود. در نهایت، شناسایی هاپلوتایپ‌های مختلف از نمونه‌های شش گونه ماهیان منطقه به عنوان یک نکته قابل توجه مطرح است که نیازمند تحقیقات بیشتر برای تأیید یا رد فرضیه‌ها درباره تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی این گونه‌هاست.

تشکر و قدردانی

این پروژه به شماره ۹۵۸۴۹۷۵۵ با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران فناوران کشور (Iran National Science Foundation: INSF) با موفقیت به انجام رسیده است.

سوم قرار دارد. همچنین وجود میش ماهی منقوت در منطقه خوزستان در مقایسه با میش ماهی معمولی در استان هرمزگان نشان‌دهنده غالب بودن گونه منقوت در غرب خلیج فارس نسبت به گونه میش ماهی معمولی در شرق آن است. اگر این فرضیه به اثبات برسد، می‌توان این گونه را به عنوان یک گونه و یا مورفوتایپ جدید و اندمیک منطقه خلیج فارس مورد بررسی قرار داد. این گونه به همراه ماهی شوریده در قالب کلاستر خاوه‌ری با اختلاف یازده درصدی همراه با نمونه‌هایی از کشور هند کلاید دوم را کامل می‌کنند که با توجه به فاصله جغرافیایی کم این منطقه نسبت به سایر مناطق دور از انتظار نبود. در این حال، تنوع هاپلوتایپی متوسط تا بالا بین گونه‌های مورد بررسی مشاهده گردید (شکل ۴).

در این پژوهش، تنوع هاپلوتایپی متوسط تا بالا بین گونه‌های مورد بررسی مشاهده شد. این میزان تنوع اغلب به بزرگ بودن اندازه جمعیت و پراکندگی گسترده در فواصل زیاد نسبت داده می‌شود که منجر به حفظ هاپلوتایپ‌های منحصربه‌فرد در طول رشد و پراکنش جمعیت می‌گردد. تراز تنوع هاپلوتایپی می‌تواند از صفر (تمام افراد جمعیت دارای هاپلوتایپ یکسان) تا یک (تمام افراد جمعیت دارای هاپلوتایپ‌های متفاوت) متغیر باشد (Hairani et al., 2023). علاوه بر این، پویایی تکاملی (جهش، رانش ژنتیکی، انتخاب طبیعی) که در سطوح مختلف بر موجود تأثیرگذار هستند، ممکن است باعث بروز الگوهای متفاوت تنوع ژنتیکی شوند (Huang et al., 2023). همچنین تنوع هاپلوتایپی متوسط بین گونه‌های مورد بررسی مشاهده گردید. به طور کلی، میزان تنوع هاپلوتایپی متوسط تا بالا برای گونه‌های دریایی غیر معمول نیست. 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 هاپلوتایپ‌های منحصربه‌فرد در طول رشد و پراکنش جمعیت می‌گردد (Mahboobeh et al., 2023). البته اندازه جمعیت ممکن است در مناطق مختلف جغرافیایی به دلیل کاهش یا افزایش جمعیت ناشی از عوامل کاهنده مانند مرگ‌ومیر و افزایش‌دهنده مانند ورود نوپاها و رشد فردی، به طور مرتب در حال تغییر بوده و در نتیجه سطوح تنوع ژنتیکی نیز، دستخوش تغییراتی گردد. علاوه بر این، پویایی تکاملی (جهش، رانش ژنتیکی، انتخاب طبیعی) که در سطوح مختلف بر موجود تأثیرگذارند، ممکن است باعث بروز الگوهای متفاوت تنوع ژنتیکی شوند (Xiao et al., 2022). همچنین ماهی سنگسر

منابع

- Evolution*, 13(10):e10641. DOI:10.1002/ece3.10641. PMID: 37877103; PMCID: PMC10590961.
- Hairani, H., Amelia, R., Susetya, I.E., Susilowati, A., Bimantara, Y., Kajita, T. and Basyuni, M., 2023.** Implementation of 16S rRNA Gene for Fish and Shrimp Barcoding in Mangrove Ecosystems in North Sumatra and Aceh, Indonesia. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. DOI:10.20473/jipk.v15i1.36686.
- Huang, W.C., Evacitas, F.C., Balisco, R.A., Nañola, C.L. Jr, Chou, T.K., Jhuang, W.C., Chang, C.W., Shen, K.N., Shao, K.T. and Liao, T.Y., 2023.** DNA barcoding of marine teleost fishes (Teleostei) in Cebu, the Philippines, a biodiversity hotspot of the coral triangle. *Scientific Reports*, 13(1):14867. DOI:10.1038/s41598-023-41832-9. PMID: 37684303; PMCID: PMC10491795.
- Mahboobeh, A., Sourinejad, I., Shahdadi, A. and Vera, M., 2023.** DNA Barcoding for Identification and Discovery of Fish Species in the Protected Mangroves of Hormozgan, Iran. *Estuaries and Coasts*, 47. <https://10.1007/s12237-023-01306-7>.
- Mer Mosharraf Hossain, M., Mojumdar, S., Farjana, N., Saiful Islam, M., Raihan, M.A., Anisur Rahman, M. and Aminur Rahman, M., 2022.** 16S rRNA genes developed a baseline of the microbial community associated with soil, water, fish and shellfishes in the sundarbans of Bangladesh. *Journal of Biological Studies*. DOI:10.62400/jbs.v5i3.7075.
- Azahar, M.A., Rosli, A., AB Rahman, N.S., BADRULHISHAM, N.S., Solehin, S.N., Rehan, A.M., Zainal, M.Z., Abdul-Latiff, M.A.B., Seah, Y.G. and Kamarudin, K.R., 2022.** Species checklist and DNA barcoding of marine fishes from Pulau Tinggi, Johor, Malaysia. *Journal of Sustainability Science and Management*, 17(11):45-55. DOI:10.46754/jssm.2022.11.006.
- Chen, M., Yang, J., He, H., Chen, Y., Chen, Z. and Liang, R., 2022.** The complete Mitochondrial genome of *Pomadasy kaakan* (Perciformes: Haemulidae). *Mitochondrial DNA Part B*, 7(4), 573-374. <https://doi.org/10.1080/23802359.2021.1999345>
- 8.Fadli, N., Jumiati, S., Razi, N.M. Damora, A., Muchlisin, Z.A., Dewiyanti, I., Ramadhaniaty, M., Harnelly, E., Habib, A. and Siti-Azizah, M.N., 2023.** DNA Barcoding of Six Commercially Important Groupers (Epinephelidae) from Langsa, Aceh, Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*, 31(2), 328-335. <https://doi.org/10.4308/hjb.31.2.328-335>.
- Fitri, D.A., Mashar, A. and Ayu, I.P., 2024.** Genetic diversity of Spotted scat (*Scatophagus argus*) based on 16s rRNA gene markers in WPP 573 Western part as management basis. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1400 012013. DOI:10.1088/1755-1315/1400/1/012013.
- Habib, K.A., Islam, M.J., Sakib, M.N., Brishti, P.S. and Neogi, A.K., 2023.** DNA barcoding of reef-associated fishes of Saint Martin's Island, Northern Bay of Bengal, Bangladesh. *Ecology*

- Panprommin, D., Soontornprasit, K., Tuncharoen, S., Pithakpol, S., Kannika, K. and Wongta, K., 2023.** DNA barcoding for fish species identification and diversity assessment in the Mae Tam reservoir, Thailand. *Fisheries and Aquatic research*, 26(9):548-557. eISSN: 2234-1757. <https://doi.org/10.47853/FAS.2023.e47>.
- Pinasti, R., Ilmi, W. and Suryani, T.A., 2021.** Genetic characterization of Dwarf Snakehead, *Channa gachua* (Hamilton, 1822), from two populations based on 16S rRNA gene. *Indonesian Fisheries Research Journal*, DOI:10.15578/ifrj.27.2.2021.99-116.
- Ram, R., Pavan-Kumar, A. and Ashok K., 2020.** Jaiswar, Pathakota Gireesh-Babu, Gopal Krishna, and Aparna Chaudhari Identification of Fish and Shellfish Larvae from Mangroves Using DNA Barcodes. *Journal of Coastal Research*, 36(5), 1106-1110. <https://doi.org/10.2112/JCOASTRES-D-19-00172.1>.
- Simon, C., Franke, A. and Martin, A., 1991.** The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification Molecular Techniques in Taxonomy In: de Francisco, A.K. and Galetti Junior, P.M. (2005). Genetic distance between broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA analyses. *Genetics and Molecular Biology*, 28(2):258-261.
- Taggart, J., McNally, S. & Sharp, P., 1990.** Genetic variability and differentiation among founder populations of the pitcher plant (*Sarracenia purpurea* L.) in Ireland. *Heredity* 64, 177-183. <https://doi.org/10.1038/hdy.1990.22>.
- Tavakoli-Kolour, P., Farhadi, A., Ajdari, A., Bagheri, D., Hazraty-Kari, S., Ghasemi, A. and Vazirzadeh, A., 2022.** Genetic species identification and population structure of grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822) collected from fish markets along the Persian Gulf and the Oman Sea. *PeerJ*, 14, 10, e14179. DOI:10.7717/peerj.14179. PMID: 36262409; PMCID: PMC9575682.
- Xiao, J., Lyu, S., Iqbal, Iqbal, T.H. Hajisamae, S., Tsim, K.W.K. and Wang, W.X., 2022.** Molecular phylogenetic and morphometric analysis of population structure and demography of endangered threadfin fish *Eleutheronema* from Indo-Pacific waters. *Scientific Reports*, 12, 3455. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07342-w>.
- Zhang, J., Xu, L., Du, F., Tang, Q., Wang, L., Ning, J., Huang, D., Li, Y., Liu, S. and Wang, X., 2023.** DNA barcoding of marine fish species in the waters surrounding Hainan Island, northern South China Sea. *Frontiers in Marine Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1249073>.
- 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, pp. 31-42.

Investigation of genetic diversity of six economically important fish species in the Persian Gulf region using 16S rRNA genome

Nahavandi R.^{1*}; Tamadoni Jahromi S.²

*Rezanahavandi91@gmail.com

1-Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

2-Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran

Abstract

The decline of aquatic resources in various parts of the world has prompted fisheries researchers to study and determine the genetic structure of valuable species in their regions using molecular methods before taking practical steps to manage economically important fish stocks, ornamental fish and mangrove forest fish. Therefore, understanding the genetic structure of various economically important species in the Persian Gulf, including the six mentioned species, appears to be essential before taking practical measures to conserve and improve these resources. This study examines specific regions of the mitochondrial genome (mtDNA), known as 16SrDNA, were successfully amplified and sequenced. Approximately 600 to 650 base pairs were amplified and reliable bases from each gene were selected for phylogenetic analysis. Sampling was conducted in target areas encompassing the key unique habitats of the six studied species in the Persian Gulf. Species include *Eleutheronema tetradactylum* (Rashgo), *Sparidentex hasta* (Sobiti), *Pomadasys kaakan* (Sangsar), *Otolithes ruber* (Shorideh), *Protonibea diacanthus* (Mish mahi manqoot), and *Pampus argenteus* (Halva sefid). These species are considered as some of the most important marine organisms in this region, and the sampling was carried out in their natural habitats. According to standard methods, at least five fin pieces of the fin from each specimen of the studied species were separated for molecular analysis and precise species identification. In this research, *Eleutheronema tetradactylum* was identified as a distinct haplotype alongside samples from Malaysia and China in Clyde III, along with a sample of *Protonibea diacanthus*. In addition, a dominant sample of *Protonibea diacanthus* was observed in the Khuzestan region compared to a sample of the common mish mahi (*Argyrosomus hololepidotus*) in Hormozgan province, suggesting that the spotted species in the western Persian Gulf versus the common mish mahi in the eastern Persian Gulf. If this hypothesis is confirmed, this species can be considered a new and endemic species or morphotype of the Persian Gulf region. This species, along with the *Otolithes ruber*, completes the second clade with a divergence of eleven percent, alongside samples from India. The common pomfret (*Pomadasys kaakan*), with greater divergence compared to the other five mentioned species, was placed in the first clade, and no differences were observed among samples of this species from Hormozgan and Khuzestan. However, this species showed a nine percent divergence with a sample from China, indicating a lack of migration and reduced allele transfer between populations. Although this species exhibited a twelve percent divergence with the silver pomfret (*Pampus argenteus*) in the same clade, and a fourteen percent divergence with the *Sparidentex hasta*, indicating sister clustering. This research demonstrates that the use of 16SrDNA sequencing can provide valuable information about the population structure of fish, genetic relationships among species in the Persian Gulf region and the ecological status of these resources. Furthermore, these findings can aid in better management of aquatic resources and conservation planning efforts.

Keywords: Genetic diversity, Persian Gulf, PCR, mtDNA, 16SrDNA