فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی۵۵، جلد۱۴، شماره۴، پاییز ۱۴۰۰، صفحه ۸۷ تا ۱۰۰
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

بررسی فیلوژنی مولکولی ماهی شانک کوپر(*Argyrops spinifer*) در محدوده خلیج فارس و دریای عمان(بندر بوشهر ،بندرعباس، بندرچابهار)

DOR:

شیرین ولی پور[۱]، **پرگل قوام مصطفوی**[۱]، محمدحسن شاه حسینی[۲]، فرهاد کی مرام[۳]
۱- گروه علوم دریایی، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی. تهران. ایران.
mostafavi_pa@srbiau.ac.ir
۲-گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس.تهران.ایران.
۳-موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.تهران.ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۵/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: ماهی کوپر(*Argyrops spinifer*) از خانواده شانک ماهیان(Sparidae) بوده که از نظر تجاری و اکولوژیکی در آب‌های جنوب ایران بسیار حائز اهمیت است. گونه های این شاخه از نظر ریخت شناختی بسیار به هم نزدیک می باشند و گاهی نام‌گذاری آن ها دچار خطا می شود. بنابراین، شناسایی مولکولی آن ها بسیار مهم می باشد.

روش کار: در این مطالعه بررسی رابطه فیلوژنی ماهی کوپر بر اساس ناحیه میتوکندریایی(CO1) و با استفاده از روش توالی یابی DNA انجام گرفت. به منظور این بررسی از بافت نرم باله دمی ۹۰ نمونه با استفاده از روش استات آمونیوم، DNA استخراج و کمیت و کیفیت آن به روش های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز انجام شد. نمونه هایDNA مطلوب برای واکنش زنجیرهای پلیمراز(PCR) و توالی یابی(Sequencing) مورد بررسی قرار گرفت. پس از تکثیر قطعه ژن و توالی یابی ، برای ترسیم درخت های تبارشناسی از نرم افزارهای Bio Edite version 7.0.1، BLAST، MEGA 7.0.2 و DnaSP 5.10.01 استفاده گردید.

یافته ها: بر اساس درخت فیلوژنی به دست آمده از توالی ها، ماهی شانک(کوپر) در مناطق بندر عباس، بوشهر و بندر چابهار، به دو شاخه اصلی تقسیم شد. تمامی نمونه های شاخه اول با شاخه دوم رابطه خواهری نشان دادند و تمام نمونه های شاخه یک و دو با نمونه‌های KJ012292 وKJ012291 از بانک ژن در منطقه ایتالیا با دقت ۸۲، ٦٧ و ٨٦ درصد رابطه خواهری نشان دادند.

نتیجه گیری: نتایج حاصل می تواند اطلاعات سودمندی در برنامه های حفاظتی و مدیریتی جهت حفظ و احیای جمعیت و ذخایراین گونه با ارزش فراهم سازد.

واژه های کلیدی: ساختار ژنتیکی، فیلوژنی، ماهی کوپر، خلیج فارس، دریای عمان.

مقدمه

خلیج فارس ، آب راهی است که در امتداد دریای عمان و در میان ایران و شبه جزیره عربستان قرار گرفته است. مساحت خلیج فارس ۲۳۷ ۴۷ کیلومترمربع می‌باشد و بعد از خلیج مکزیک و خلیج هادسون سومین خلیج بزرگ جهان به نامیده می شود. این خلیج به واسطه تنگه هرمز به دریای عمان و از طریق آن به دریاهای آزاد وصل می باشد(۱). ارتباط کشور ایران از طریق استان‌های بوشهر، هرمزگان و خوزستان به خلیج فارس می‌باشد، که در این بین استان بوشهر با بیش از ۶۰۰ کیلومتر بیشترین مرز آبی با این خلیج را دربرگرفته است(۲۵). در آب‌های خلیج فارس و دریای عمان ماهیان متنوعی وجود دارد که یک گونه تجاری و خوراکی این ماهیان

که در بازار جنوب ایران به عرضه می رسد، ماهی کوپر می باشد. ماهی کوپر تقریباً در تمام آب های گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان پراکنش دارد و خلیج فارس و دریای عمان هم از این قاعده کلی مستثنی نیست(۱). *Argyrops spinifer* متعلق به خانواده شانک ماهیان و راسته سوف ماهی شکلان در آب های جنوب ایران(خلیج فارس و دریای عمان) و از غرب تا شرق اقیانوس هند و در شمال استرالیا وجود دارند(۲۹). این ماهی کف زی است(۳۲). ماهیان جوان تر در نواحی کم عمق به صورت گروهی و ماهیان بالغ و بزرگ تر در آب های عمیق تر به صورت انفرادی پراکنش دارند(۲۸). طول این ماهی به ۷۰ سانتی مترمی رسد و به طور متوسط طول این ماهی ۳۰ سانتی متر می باشد(۲۹). این گونه از بی مهرگان کف زی، نرم تنان، میگوها، خرچنگ ها و نکتون ها تغذیه می کند. تغییر جنسیت یک استراتژی تولیدمثلی معمول در بین آن ها است(۵،۱۱،۱۸). مطالعاتی که در آب های جنوب ایران صورت گرفت، خصوصیات پویـایی جمعیـت مـاهی کـوپرنشان داد که میزان صید در ماه های سال یکسان نبوده و این ماهی از پراکندگی یکسانی در آب های استان برخوردار نمی- باشد و بیشترین صید آن درماه اردیبهشت صورت می- پذیرد(۱۶). این گونه در حالی که از ماهیان تجاری درخلیج فارس و دریای عمان می باشد، جمعیت آن درخلیج فارس به دلیل صید مدیریت نشده و فعالیت های انسانی کاهش زیادی داشته است. صید بی رویه به دلیل افزایش نیاز بشربه تامین غذا و مصرف منابع آبزیان و همسو با آن عواملی هم چون تخریب زیستگاه ها و انواع مختلف آلودگی های محیطی و قابلیت محدود در بازسازی ذخایر، باعث آسیب پذیری جوامع آبزیان شده است. وضعیت ذخایر گونه *A.spinifer* در آب های استرالیا نیز در حال کاهش است. به همین دلیل شیلات استرالیا تعداد مجوزهای ماهیگیری تجاری برای آن را بسیار محدود وکنترل کرده است(۳۳). هم چنین در دریای چین جمعیت خانواده شانک ماهیان در طول ۲۰ سال گذشته به طور قابل توجه کاهش داشته است(۱۴). به دلیل وجود تعداد زیاد جنس و گونه، که اکثراً شباهت زیادی به یک دیگر دارند، تعیین وتفکیک یک ساختار فیلوژنی مشخص برای این خانواده بسیار طاقت فرسا می- باشد. در گذشته بیشتر مطالعات برای طبقه بندی شانک ماهیان بر مبنای روش های مورفومتریک و مریستیک انجام می پذیرفت ولی با پیشرفت روش های ژنتیکی تکنیک های مولکولی بر پایه DNA میتوکندریایی، روش های قبلی جای خود را به روش های نوین دادند(۱۳). داده های مولکولی که به شکل توالی های DNA یا پروتئین وجود دارند، قادرهستند چشم انداز تکاملی بسیاردقیق و قابل قبولی ازموجودات فعلی را نشان دهند. زیرا تکامل موجودات باعث انباشته شدن جهش- های مواد ژنتیکی، در طول زمان می شود که موجب تغییر فنوتیپی وریختی موجودات است. به این دلیل، ژن‌ها که محل حفظ جهش های انباشته شده می باشند، می- توانند به عنوان فسیل های مولکولی نامیده شوند و با بررسی مقایسه ای فسیل های مولکولی موجودات مرتبط، این امکان وجود دارد که تاریخچه تکاملی ژن ها و حتی جانداران را مشاهده کرد(۱۷،۲۲). مطالعات صورت گرفته بر روی DNA میتوکندریایی در واقع روشی حساس و دقیق است که از آن جهت نشان دادن شباهت ژنتیکی، رده بندی های فیلوژنتیکی و تفاوت های ژنتیکی بین جمعیت های یک گونه استفاده می شود(۱۰). امروزه طبقه بندی و بررسی میزان تنوع در جمعیت ها با استفاده از تفاوت توالی DNA انجام می شود. واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) یک تکنیک آزمایشگاهی دقیق می باشد که همانند سازی و تکثیر قطعه ای ازDNA را به میلیون‌ها برابرآن امکان پذیر می کند. بخش بسیار کوتاهی از توالیDNA حاوی اطلاعات بسیار زیادی برای تعیین ۱۰

یا حتی ۱۰۰ میلیون گونه از موجودات مختلف می باشد. در این میان بخشی از توالی ژن کدکننده سیتوکروم اکسیداز I به عنوان یک نشان گر ژنتیکی در بین افراد یک گونه عموماً اختلاف بسیارکمی(کمتر از ۱٪) را نشان می دهد و در جمعیت هایی با خویشاوندی بسیار نزدیک هم باعث تمایز گونه ها می باشد(۲۱). در بین نشان گرهای ژنتیکی، از توالی یابی ژنوم میتوکندریایی استفاده می شود، که یکی از روش های بسیار کاربردی برای تعیین و بررسی رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت ها وگونه های نزدیک به هم می باشد. توالی یابی میتوکندری با مقایسه نوکلئوتیدها و مشخص شدن اختلاف بین توالی های مختلف، تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتایپی صورت می پذیرد. با استفاده از این اطلاعات، رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت ها و فیلوژئوگرافی گونه ها ترسیم می گردد(۸). به طور کلی نشانگرهای میتوکندریایی به واسطه دستیابی به داده ها و قدرت تجزیه و تحلیل بالا برای استفاده در مطالعات تکاملی بین جانداران و ژنوم آن ها بسیار مورد اطمینان می باشد(۱۵). بررسی پایگاه داده های مولکولی مشخص می کند که تاکنون اطلاعاتی از این گونه ثبت نشده و بررسی روابط فیلوژنی آن از لحاظ اقتصادی و ملی حائز اهمیت است(۳۵). بررسی ساختار فیلوژنی این گونه در حوزه-های مورد مطالعه، پیش نیازی جهت انجام فعالیت های زیست شناسی مولکولی می باشد(۷). بررسی ساختار ژنتیکی ماهیان می تواند اهمیت بالایی در مدیریت برداشت ذخایر و بازسازی گونه‌های مهم تجاری در خطر داشته باشد. در دسترس نبودن داده‌های ساختار ژنتیکی جمعیت ماهیان در درازمدت پیامدهای نامطلوبی به ویژه بر روی جمعیت‌های مورد بهره‌برداری به دنبال دارد. به همین دلیل نیازمند بررسی دقیق تنوع ژنتیکی آبزیان می-باشد(۱۲،۲۰). مدیریت صحیح ذخایرآبزیان و توسعه آبزی پروری زمانی با موفقیت همراه اعمال خواهد شد که ذخایر ژنتیکی گونه های بومی منطقه به شکل دقیق و بر پایه اصول ژنتیکی شناسایی شود و قبل ازشروع و اجرای هر برنامه مدیریتی یا تولیدی لازم است تا ساختار ژنتیکی جمعیت های مربوطه را مشخص و با روش های مولکولی ارزیابی کرده و سپس برنامه مدیریتی را برای حفظ و بازسازی ذخایر آن انجام داد(۲). گونه *A.spinifer* یکی از گونه های مهمی است که در معرض برداشت بی رویه در آب های جنوبی ایران قرارگرفته و علی رغم اهمیت اقتصادی بالای این گونه اطلاعاتی در رابطه با ساختار فیلوژنی و جمعیتی در خلیج فارس و دریای عمان ثبت نشده است(۴). بنابراین مطالعه حاضر با هدف تعیین ساختار ژنی، رابطه تکاملی و احتمال وجود رابطه خواهری بین جمعیت های گونه *A.spinifer* در خلیج فارس و دریای عمان برای اولین بار از ژن CO1 به اجرا در آمد.

مواد و روش ها

نمونه برداری

از ماهی(*Argyrops spinifer*) با استفاده از کشتی-های ترال ومناطق تخلیه در آب های خلیج فارس و دریای عمان(شامل بنادر صید گاهی، بندر عباس، بندر چابهار، بوشهر) به تعداد ۳۰ عدد از هر منطقه بطور هم زمان نمونه برداری انجام شد جدول(۱).

جدول ۱- موقعیت جغرافیایی مناطق و تعداد نمونه های برداشت شده

منطقه			تعداد نمونه
بندر عباس	56° 17' 00" E	27° 11' 00" N	30
بندر بوشهر(دلوار)	51° 28.75" E	28° 47' 28. 63" N	30
چابهار(ساحل رمین)	60° 44' 58" E	25° 16' 30" N	30

شکل۱- موقعیت جغرافیایی مناطق (بندر عباس، بوشهر و چابهار)

استخراج DNA وطراحی پرایمر

برای شناسایی مولکولی از هر منطقه ۱۰ نمونه انتخاب گردید. ۱۰۰-۵۰ میلی گرم از بافت نرم باله دمی گرفته شد و به تیوپ ۱/۵ میلی لیتر اضافه گردید، DNAنمونه ها به روش استات آمونیوم استخراج شد. کمیت برای DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری(سنجش غلظت نمونه ها با استفاده از دستگاه نانودراپ در طول موج های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر) و کیفیت نیز با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز۱ درصد تعیین گردید. آغازگرهای طراحی شده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر منطقه مورد نظر(CO1) ژنوم میتوکندریایی، صورت پذیرفت(۳۷).

آغازگر پیشین: ۵'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'

آغازگر پسین: ۵'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'

واکنش زنجیرهای پلیمراز

به منظور تکثیر قطعه های مورد نظر ژن CO1 میتوکندریایی با استفاده از۰/۵ میکرولیتر(۵۰ نانوگرم) از DNA ژنومی، ۰/۳ میکرولیتر از هر آغازگر اختصاصی پیشرو و پسرو، ۱/۵واحد از Taq DNA Polymerase ، ۵۰ میلی مولار Tris ، ۱/۵ میلی مولارMgCl2 ، ۰/۲ میلی‌مولارdNTPs ، ۱۰ میلی مولارKCL ، تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر تحت شرایط دمایی ۹۴ درجه سانتی- گراد، به مدت ۵ دقیقه، با تعداد ۳۰ سیکل انجام گرفت و هر کدام شامل ۳۰ ثانیه واسرشت شدن در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۶۰ثانیه اتصال پرایمرها (annealing) در ۶۳/۲ درجه سانتی گراد، ۳۰ثانیه تشکیل رشته مکمل (extension) به دنبال پرایمرها در ۷۲درجه سانتی گراد و سپس در انتهای واکنش، ۵دقیقه تشکیل رشته مکمل در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام پذیرفت. پس از اتمام واکنش تکثیر، مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه برروی ژل آگارز۱ درصد قرار گرفت تا کیفیت قطعات ژنی بعد ازتکثیر مورد ارزیابی و بررسی های لازم قرار گیرد. باند مورد نظر bp650 را نشان داد که صحت آن مشخص شد. نمونه های منتخب گروه ها(۳۰ نمونه) از منطقه CO1 ژنوم میتوکندریایی تحت واکنش زنجیره ای مجدد قرار گرفت و µl 40 از محصولات نهایی PCR با باند های(پر رنگ و ضخیم فاقد اسمیر، فاقد دایمر پرایمر، باند غیر اختصاصی) به همراه پرایمر پیشین (Forward) جهت تعیین توالی به روش ختم زنجیره (Dideoxy Chain Termination)بر اساس پرایمر اختصاصی به شرکت (Bioneer) واقع در کره جنوبی ارسال گردید .

نحوه پردازش آماری

تعداد ۱۰ نمونه منتخب از هر منطقه برای تحلیل و آنالیز داده ها توسط نرم افزار ها، انتخاب شد. در این مطالعه از نرم افزار Bio Edite version 7.0.1 (19)به منظور بازبینی و اصلاح توالی ها استفاده شد. از نرم افزار BLASTبرای ردیف سازی توالی ها (Basic Local Alignment Search Tool)با بانک ژنی (NCBI: National Center for Biotechnology Information) استفاده گردید و هم چنین از نرم افزار MEGA 7.0.2 (34) برای به دست آوردن تعداد آلل‌ها، بازها و رسم درخت فیلوژنتیک استفاده شد. از نرم افزار

DnaSP 5.10.01نیز برای تعیین تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی استفاده گردید. در ترسیم درخت فیلوژنتیکی نتایج حاصل از آزمون فیلوژننتیکی بر اساس تشابه حداکثر با بوت استرپ۱۰۰۰ مرتبه بر اساس مدل(GTR+G+I) با مقدار آماره G برابر با ۰/۷۳ به عنوان برترین مدل تکامل نوکلئوتیدی برای قطعه مورد نظر(سیتوکروم اکسیداز۱) توسط نرم‌افزار Mr modeltest 2 شناسایی گردید. تجزیه و تحلیل ماتریس داده ها دردرخت فیلوژنی بر اساس روش های مبتنی بر احتمال برآورد حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood)، بیشینه صرفه‌جویی (Maximum Parsimony)و (Bayesian) انجام شد(۳۴، ۲۴).

نتایج

نتایجPCR

کیفیت DNA استخراج شده از نظر شکستگی و یا عدم شکستگیDNA ، وجود آلودگی‌های پروتئینی یا RNA توسط روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد، مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دهنده آن بود که DNA استخراج شده با این روش مناسب و قابل قبول می باشد. با بررسی محصول واکنش زنجیره های پلیمراز با استفاده از شیب دمایی، بهترین دمای اتصال آغازگر به رشته الگو مشخص گردید. کیفیت و کمیت محصول PCR بر روی ژل آگارز ۵/۱درصد مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت و باند های حاصل در محدوده ۶۵۰ جفت بازی مشاهده شدند(شکل۲). برای بررسی تنوع هاپلوئیدی و نوکلئوتیدی داده های حاصل از توالی یابی، از هر منطقه داده هایی جهت BLAST در پایگاه جهانی ژن انتخاب گردید، که نتایج به دست آمده نشان دهنده صحت داده های توالی یابی شده در این مطالعه بودند. نتایج بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کوپر در خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از توالی یابی ژن CO1 با طول تقریبی ۶۵۰ جفت باز، با استفاده از نرم افزار(DnaSP (DNA Sequence Polymorphism جایگاه های چند شکلی(polymorphic) در سه منطقه بندر عباس، چابهار و بوشهربه مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته شد. هم چنین الل های مشاهده شده در بندر عباس ۱۰، در چابهار ۱۰ و در بوشهربه میزان کمتر و برابر۴ الل و با میانگین ۴۶.۳ ± ۸ برای سه منطقه مورد محاسبه قرار گرفت. تنوع نوکلئوتیدی، تعداد هاپلوتایپ ها و تنوع هاپلوتایپی در ۳منطقه(بندر عباس، بوشهر و چابهار) محاسبه گردید جدول(۲). فراوانی هر یک از باز های تیمین، سیتوزین، آدنین و گوانین با استفاده از نرم افزار۷/۰/۲۶ MEGA محاسبه شد. بر این اساس ژن CO1 ماهی کوپر با ۶۵۰ جفت باز در منطقه بندرعباس، دارای بازتیمین با فراوانی ۳۱/۳۲ درصد، باز سیتوزین با فراوانی ۲۹/۰۹درصد، باز آدنین با فراوانی۲۴/۳۹ درصد و باز گوانین با فراوانی ۱۵/۲ درصد به دست آمد. ژن CO1 در منطقه بوشهر، دارای بازتیمین با فراوانی ۲۹/۶۳درصد، باز سیتوزین با فراوانی ۲۹/۹۲درصد، باز آدنین با فراوانی ۲۳/۱درصد و باز گوانین با فراوانی ۱۷/۳۵ درصد محاسبه گردید و ژن CO1 در منطقه چابهار، دارای بازتیمین با فراوانی ۳۰/۵۴ درصد، باز سیتوزین با فراوانی ۲۸/۵۷درصد، باز آدنین با فراوانی ۲۴/۰۷درصد و باز گوانین با فراوانی ۱۶/۸۳ درصد را نشان داد جدول(۳)، نمودار(۱). از توالی های ثبت شده در بانک ژن جهانی جهت شناسایی نمونه ها استفاده شد. برخی از این توالی ها به عنوان توالی های مرجع در رسم درخت فیلوژنتیک مورد استفاده قرار گرفتند. گونه ها و شماره ثبت توالی های استفاده شده برای قطعه ژنی CO1 در بانک ژن که در آنالیز مولکولی جنس *Argyrops spinifer* مورد بررسی و استفاده قرار گرفتند در جدول(۴) آورده شده است.

جدول۲-چند شکلی بودن DNA (DNA Polymorphism) تنوع هاپلوئیدی و نوکلئوتیدی ۳ منطقه(بندر عباس، بوشهر و چابهار)

	Number of sequences	Number of haplotypes	Haplotype diversity	Nucleotide diversity(Pi)	Average number of differences(K)
بندر عباس	۱۰	۱۰	۱/۰۰۰	۰/۳۷۱۷	۲۳/۰۴۴
بوشهر	۱۰	۴	۰/۵۳۳	۰/۰۱۳۱۰	۸/۲۰۰
بندر چابهار	۱۰	۱۰	۱/۰۰۰	۰/۰۰۵۳۹	۳/۳۵۶

جدول۳-درصد ترکیبات نوکلئوتیدی ماهی کوپر در سه منطقه مورد مطالعه(بندرعباس، بوشهر وبندر چابهار)

	٪A	٪T	٪C	G%	AT%	٪GC	میانگین
بندرعباس	۲۴/۳۹	۳۱/۳۲	۲۹/۰۹	۱۵/۲	۵۵/۷۱	۴۴/۲۹	۳۳/۳۳
بوشهر	۲۳/۱	۲۹/۶۳	۲۹/۹۲	۱۷/۳۵	۵۲/۷۳	۴۷/۲۷	۳۳/۳۳
بندر چابهار	۲۴/۰۷	۳۰/۵۴	۲۸/۵۷	۱۶/۸۳	۵۴/۶۱	۴۵/۴	۳۳/۳۳
میانگین	۲۳/۸۵	۳۰/۴۹	۲۹/۱۹	۱۶/۴۶	۵۴/۳۵	۴۵/۶۵	۳۳/۳۳

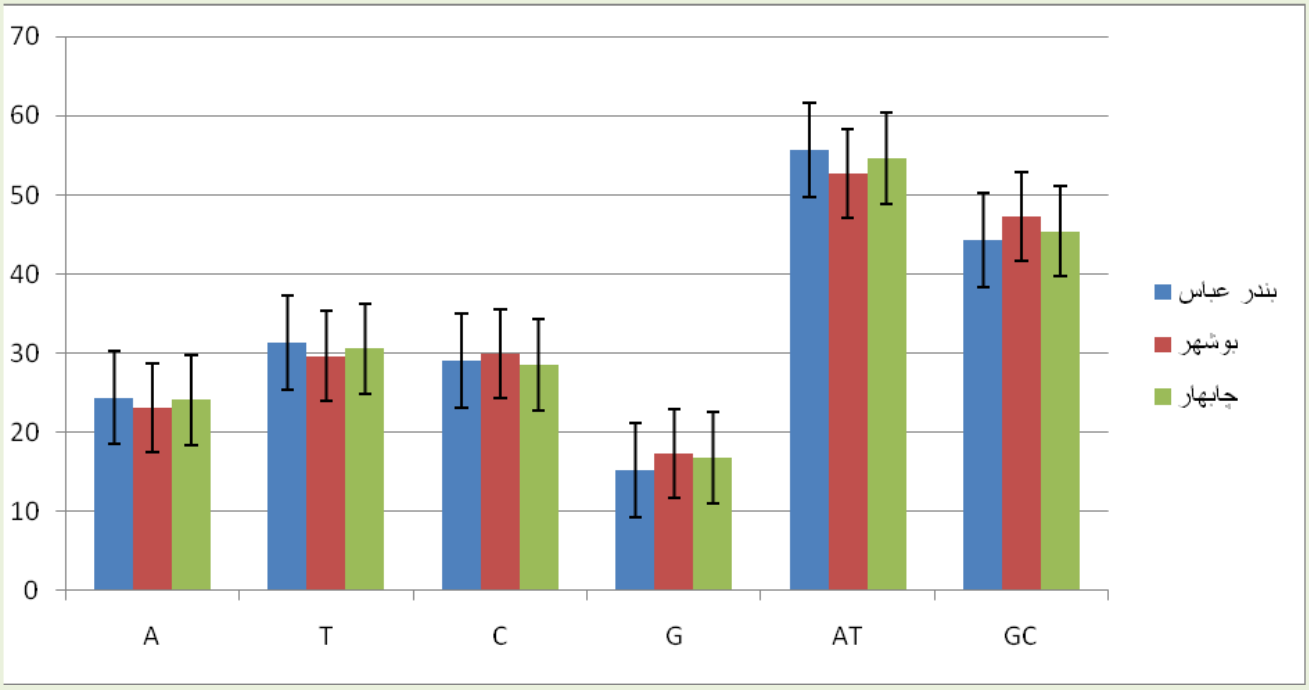
جدول٤-اسامی گونه ها و شماره ثبت توالی های استفاده شده برای قطعه ژنی CO1 در بانک ژن

نام گونه	Gen Bank No	نام گونه	Gen Bank No
Scorpaenopsis diabolus	MF124049	*Pagellus acarne*	KM538459
Serranus auriga	HQ991935	*Pagrus caeruleostictus*	KU757072
Diplodus noct	MF123859	*Dentex gibbosus*	MG981611
Oblada melanura	KJ012380	*Pagrus pagrus*	KJ012421
Sarpa salpa	KC501262	*Dentex dentex*	MG981668
Boops boops	MK317921		

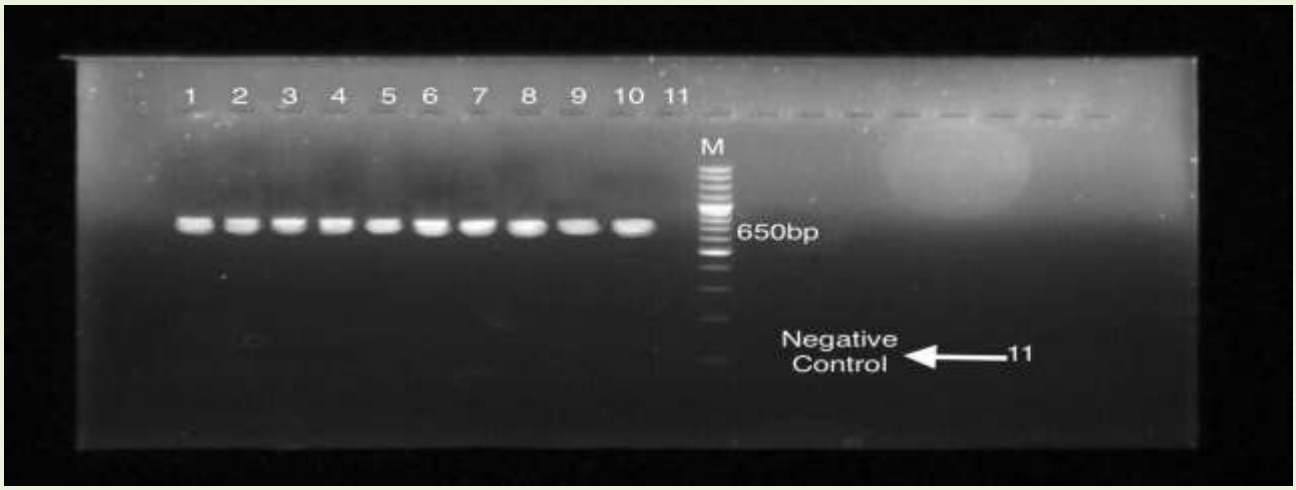
آنالیز درخت فیلوژنی

بر اساس درخت فیلوژنی به دست آمده از توالی ها، ماهی شانک(کوپر) در مناطق بندر عباس، بوشهر و بندر چابهار، به دو شاخه(کلاد) اصلی تقسیم شد. در کلاد اول نمونه های بندرعباس، بندر چابهار و یک نمونه از بوشهر با دقت ۱۰۰٪ در درخت Maximum Likelihood (ML)، ۹۹٪ در درخت Maximum parsimony (MP) و ۱۰۰٪ در درخت Bayesian در کنار هم قرار گرفتند. در تمام نمونه های شاخه اول به ترتیب با دقت ۵۱، ۵۱ و ۱۰ درصد رابطه خواهری با شاخه دوم نشان دادند. در کلاد دوم ۸نمونه با نمونه های ثبت شده در بانک ژن HQ149795، HQ149793، KJ012293و HQ149796 قرار گرفتند و رابطه خواهری با نمونه ۱۱ بوشهر نشان دادند. نمونه های DQ107837 و DQ107836 از استرالیا در بانک ژن با کلاد اول رابطه

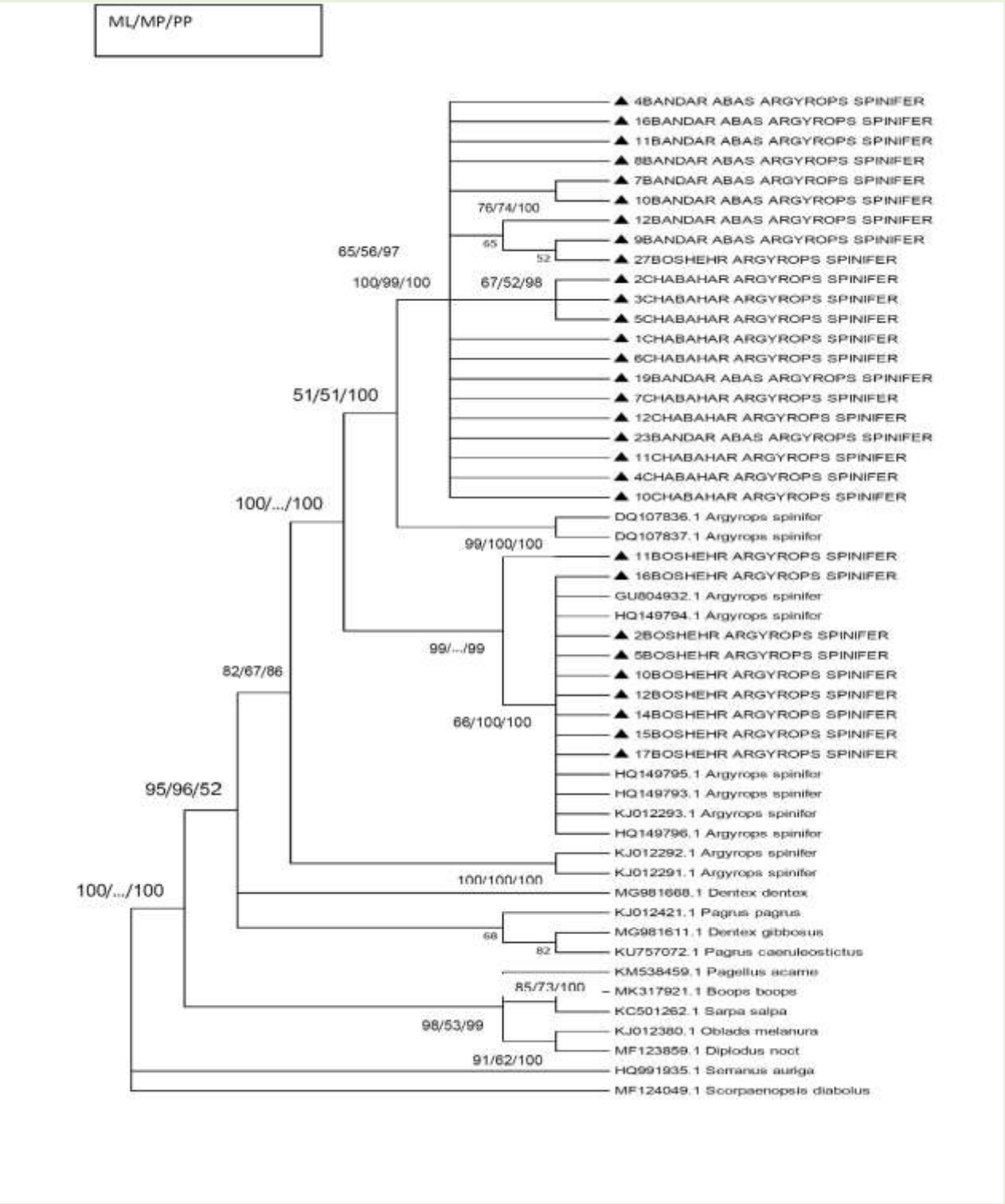
خواهری نشان دادند. نمونه های ۲، ۳ و۵ بندر چابهار به ترتیب با دقت ۶۷، ۵۲ و ۹۸ درصد رابطه خواهری با هم نشان دادند. نمونه‌های۷، ۱۰ و ۱۲ بندر عباس به ترتیب با دقت ۷۶، ۷۴ و ۱۰۰ درصد رابطه خواهری دارند. نمونه-های بوشهر با چهار نمونه از بانک ژن ایران و استرالیا با دقت ۶۶، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصدرابطه خواهری نشان دادند. تمام نمونه های کلاد ۱ و ۲ با نمونه‌های KJ012292 و KJ012291 از بانک ژن ایتالیا با دقت در هر سه درخت فیلوژنی رابطه خواهری نشان دادند.



نمودار۱-درصد ترکیبات نوکلوئیدی کوپر در سه منطقه مورد مطالعه



شکل۲: محصول PCR ماهی کوپر با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز (CO1) پس از الکتروفورز ژل آگارز1/5٪



شکل ۳-درخت رابطه خویشاوندی (ML, MP و PP) برای ماهی کوپر (*Argyrops spinifer*)

با ۱۰۰۰ بار تکرار(اعداد کنار شاخه ها درصد تکرار در آزمون bootstrapاست)

بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر اولین مطالعه مولکولی جنس *Argyrops spinifer* در خلیج فارس و دریای عمان می- باشد. هدف از این پژوهش شناسایی هاپلوتایپ های مختلف ماهی کوپر و بررسی روابط فیلوژنی آن در سه منطقه از آب های جنوب ایران می باشد. یکی از مواردی

که در روش توالی یابی ژنوم میتوکندریایی مورد بررسی قرار می گیرد، درصد نوکلئوتیدهای های مختلف می-باشد. در این بررسی میانگین ترکیب نوکلئوتیدی A: 8/23، T: 49/30، C: 19/29و G: 46/16 درصد با نسبت CG: 65/45درصد به دست آمد. WARD و همکاران در پژوهش خود میانگین نسبت CGرا در سیتوکروم اکسیدازیک در ۱۴۳ گونه از ماهیان استخوانی ۴۷/۱ درصد و در بین ۶۱ گونه از ماهیان غضروفی۴۲/۳ درصد محاسبه کردند. در تحقیق دیگری مسافر و همکاران در ۳۴ نمونه از ماهی *Atrobucca nibe* نسبت CG را ۴۲/۴۶ درصد محاسبه کردند. نتایج بررسی حاضر نشان‌دهنده اختلاف نسبی با نتایج ذکر شده از ماهیان دیگر خانواده ها را نشان داد(۷). دلایل تفاوت در نسبت در ماهیان مختلف هنوز شناخته شده نیست و احتیاج به تحقیقات بیشتری دارد(۳۷). هاپلوتایپ شاخص مناسبی برای محاسبه میزان گوناگونی ژنتیکی بین جمعیت های مختلف می باشد. تراز تنوع هاپلوتیپی می تواند از صفر(تمام افراد جمعیت دارای هاپلوتایپ های مشابه) تا یک(همه افراد جمعیت دارای هاپلوتایپ های متفاوت) تغییر کند(۹). در این تحقیق بیشترین تعداد هاپلوتایپ تعداد ۱۰ برای بندرعباس و چابهار محاسبه شد و برای بوشهر ۴ هاپلوتایپ ثبت گردید. تنوع هاپلوتایپی در بندر عباس برابر ۱/۰۰۰، در بوشهر برابر۰/۵۳و در چابهار برابر ۱/۰۰۰ محاسبه شد. تنوع نوکلئوتیدی در بندر عباس به مقدار۰/۷۰۳، در بوشهر به مقدار۰/۰۱۳ و چابهار به مقدار۰/۰۰۵ محاسبه گردید. هم چنین میانگین تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی به ترتیب در سه منطقه ۲۳/۰۴۴، ۸/۲۰۰ و ۳/۳۵۶ به دست آمد. در شرح این مطلب دلایل گوناگونی را می‌توان در نظر گرفت: ناحیه بندرعباس وچابهار زیستگاه جمعیت های مختلفی از گونه مورد نظر می باشد و یا افزایش شاخص های ذکر شده را می‌توان نشان‌دهنده پویایی ژنتیکی بالا و مناسب تر بودن ساختار جمعیتی این ناحیه از آب های جنوبی نسبت به منطقه بوشهر، به علت فرصت بیشتر به دلیل تکثیر طبیعی، بهره برداری بهتر از منابع شیلاتی آن منطقه و عدم تخریب زیستگاه طبیعی در نظر گرفت. همان طور که ذکر گردید پارامترهای مورد بحث در بوشهر نشان داده شد. دادن یک معنای زیستی به پارامترهای یاد شده آسان نیست و نتایج حاصل شده می تواند استرس‌های محیطی این منطقه را نشان دهد، بوشهر یکی از مناطق صید و صیادی کشور می باشد و در نتیجه با توجه به بالا بودن تردد کشتی ها، افزایش استرس و آلودگی این ناحیه دور از ذهن نمی باشد(۳۸). سعیدی و همکاران با توالی-یابی mtDNA در ماهیLiza aurata، میزان تنوع هاپلوتیپی ۱/۰۰۰ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۷۳محاسبه کردند(۳۱). رضوانی و همکاران با توالی یابی DNA میتوکندری هایی گونه میانگین تنوع هاپلوتایپی را ۰/۴۴ و میانگین تنوع نوکلئوتیدی را۰/۰۰۷ محاسبه کردند(۳). پارامترهای ذکر شده در گونه های مختلف نتایج متفاوتی را نشان می دهد. بررسی رابطه فیلوژنی جمعیت های گونه مهم و اقتصادی *Argyrops spinifer* با بخشی از ژن سیتوکروم اکسیدازیک میتوکندریایی و روش توالی‌یابی DNA انجام شد. درسال های اخیرتحقیقات بر روی ساختار ژنتیکی گونه های مختلف آبزیان با استفاده از روش های نوین مولکولی بسیار رایج شده و استفاده از نتایج آن ها باعث اعمال مدیریت علمی و صحیح در راستای حفظ ذخایرآبزیان شده است و هم چنین سبب افزایش میزان تولید در صنعت آبزی پروری می-باشد(۲۶). ارائه فرضیاتی برای به کارگیری داده های مولکولی به دلیل بازسازی تاریخچه تکاملی لازم می-باشد. فرض اول عبارت است این باور، که توالی های مولکولی مورد استفاده در ساختار فیلوژنتیکی هومولوگ می باشند، یعنی یک جد مشترک وجود دارد که طی سپری شدن زمان از آن فاصله گرفته شده است. فرض

دوم این است که هر ناحیه ای در توالی به شکل مستقل تکامل پیدا می کند. بنابراین تفاوت توالی ها اطلاعات کافی و لازم را برای ساخت و رسم درخت های فیلوژنتیک ارائه می دهند(۱۷،۲۷). در میان تکنیک های مولکولی، تکنیک توالی یابی به دلیل سادگی روش کار و دقت بسیار بالا دارای جایگاه ویژه ایمی باشد. دقت فراوان این روش، باعث کاهش تعداد نمونه های مورد نیاز برای انجام پژوهش می شود و محققان را قادر می-سازد که برای مطالعه رابطه فیلوژنتیکی، از دو، سه یا حتی یک عدد از نمونه های موجود در مناطق مختلف استفاده کنند(۶). Ketmaier و همکارانش در بررسی فیلوژنتیکی *Rutilus rutilus* مناطق اطراف مدیترانه تنها از سه نمونه در هر منطقه استفاده کردند(۲۳) .بررسی درخت ترسیم شده در این پژوهش از نمونه های مورد مطالعه در کنار سایر گونه های شانک ماهیان نشان می دهد که ماهی کوپر در مناطق مختلف مورد بررسی در دو خوشه تقسیم شدند، که تمام نمونه های شاخه اول با شاخه دوم رابطه خواهری نشان دادند. این نتیجه، حاکی از قرابت ژنتیکی نزدیک گونه مورد بررسی در جمعیت های مختلف می-باشد. در کلاد اول نمونه ها بندرعباس، بندر چابهار و یک نمونه از بوشهر با دقت ۱۰۰٪ در درخت Maximum Likelihood (ML)، ۹۹٪ در درخت(MP) Maximum Parsimony و ۱۰۰٪ در درخت Bayesian در کنار هم قرار گرفتند و نمونه های *Argyrops spinifer* از استرالیا در بانک ژن با کلاد اول رابطه خواهری نشان دادند. در کلاد دوم ۸نمونه با نمونه-های انتخاب شده در بانک ژن (گونه Argyrops spinifer در نقاط مختلف جهان) رابطه خواهری با نمونه ۱۱ بوشهر نشان دادند. تمام نمونه های هر دوشاخه با نمونه‌های KJ012292 و kJ012291 از بانک ژن ایتالیا با دقت در هر سه درخت فیلوژنی رابطه خواهری نشان دادند. در این مطالعه کلاد اول و دوم هر دو با ۴ گونه *Dentex dentex*، *Pagrus pagrus*، *Dentex gibbosus*، *Pagrus caeruleostictus* رابطه خواهری نشان دادند. Thomas و همکاران با بررسی ۳۸ گونه پراکنده از خانواده شانک ماهیان توسط آنالیز توالی منطقه سیتوکروم‌b ژنوم میتوکندریایی مشاهده کردند گونه های گروه های مورد بررسی مونوفیلتیک بوده و از یک جد مشترک مشتق می شوند(۳۶). در بررسی دیگری از خانواده شانک ماهیان، Satoru و همکاران با یک مطالعه وسیع بر روی خانواده شانک ماهیان توسط آنالیز توالی منطقه سیتوکروم‌b ژنوم میتوکندریایی روی ۱۸ توالی ۲۳ گونه از این خانواده با رسم درخت به روش‌های بیزی و حداکثر احتمال(ML) مشاهده کردند ۳ شاخه به دست آمده دارای موقعیت های غیر مونوفیلتیک و در قسمتی پارافیلتیک می باشند و در انواع مختلفی تقسیم شدند(۳۰). با توجه به نتایج حاصل شده در این پژوهش نشان داده شد که گونه *Argyrops spinifer* در مناطق مختلف خلیج فارس و دریای عمان ارتباط نزدیکی با هم دارند و پیشنهاد می شود تا مطالعه جامع تری بر روی تمامی گونه های شانک ماهیان ایران به منظور بررسی تنوع و قرابت ژنتیکی بین آن ها صورت پذیرد. اطلاعات دقیق و کاملی از وضعیت جمعیتی و اکولوژیکی آن ها ثبت گردد. در نهایت این تحقیق می-تواند کمکی باشد به مسئولین شیلاتی و محیط زیستی تا درمدیریت، حفظ و احیای جمعیت گونه های منحصر به فردو با ارزش روش های صحیح مدیریتی را جایگزین کنند.

منابع

۱–پیغمبری، س.ی.، مقیمی تیلمی، ب.، پولادی، م.، دلیری، م. ۱۳۹۸. تراکم و پراکنش ماهیان کوپر ((Forsskal,1775) *Argyrops spinifer*، گیش پهن (Bleeker,1852) *Carangoides talamparoides*، و حسون معمولی(۱۷۹۵ *Saurida tumbil* (Bloch, در فصل بهار، خلیج فارس (استان بوشهر). نشریه پژوهش های ماهی شناسی کاربردی. دوره هفتم، شماره سوم. ۷۵–۵۹.

۲–رضوانی گیل کلائی، س.۱۳۸۰. بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) در دریای عمان و خلیج فارس با استفاده ار ژن سیتوکروم اکسیداز۱ (COI) به روش.RFLP مجله علمی شیلات. سال دهم. شماره ۲ .ص ۳۰–۱۵.

۳–رضوانی، س.، رزمجو، ا.، قوام مصطفوی، پ.، نیرانی، م.، تقوی، م.ج.، لالوئی،ف. ۱۳۸۹. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت گاو ماهی خزری در غرب و مرکز سواحل جنوبی دریای خزر. موسسه تحقیقات شیلات ایران. سال دوم. شماره ۳. ص۲۶–۱۰.

٤–صفری، ر.، قاسمی، ا.، رضوانی گیل کلائی،س.، غفاری، ه. ۱۳۹۸. بررسی ساختار ژنتیک جمعیتی خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* درسواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از روش توالی یابی DNA. موسسه تحقیقات علوم شیلات ایران.سال ۲. شماره ۲.ص۵۱–۴۲.

۵–قنبرزاده، م.، محبوبی صفویانی،ن.، کیوانی، ی.، اسداله،س.،اله تقوی مطلق، ا.۱۳۹۱. تعیین پارامترهای رشد ماهی کوپر(*Argyrops spinifer*) با استفاده از روش های پیشینه پردازی و داده های حاصل از تعیین سن در سواحل استان بوشهر. موسسه تحقیقات علوم شیلات ایران. دوره ۲۱. شماره ۴. ص۷۶–۵۹.

٦–کلنگی میاندره، ح.، شعبانی، ع.، حجتی، م. ۱۳۹۳. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سفید (۱۹۰۱ *Rutilus kutum* Kamensky)، برخی از رودخانه های حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از توالی یابی ژن سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی(mtDNACytb). نشریه پژوهش های ماهی شناسی کاربردی. دوره سوم. شماره دوم. ۴–۹ صفحه.

۷–مسافر، م.، رضوانی گیل کلائی،س.، قوام مصطفوی. ۱۳۹۵. ژنتیک جمعیت ماهی شبه شوریده دهان سیاه *Atrobucca nibe*(Jordan and Thompson, 1911) در سواحل شمال غربی دریای عمان با استفاده از روش PCR-sequencing. موسسه تحقیقات شیلات ایران.دوره ۱۱.شماره ۲. ص۱۰۳–۹۱.

۸–ولی زاده، ر. نصیری، م. صادقی، ب. قوتی،ش. جوادمنش،ع. ۱۳۸۹. تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی نواحی D- loop و Cyt-b توالی DNA میتوکندری در گاوهای سیستانی، سرابی و براون سوئیس ایران. نشریه پژوهش های علوم دامی ایران، جلد ۳. شماره۴، صفحات ۴۴۵ تا ۴۵۲.

9.Aboim, M.A., Menezes, G.M., Schlitt, T., Rogers, A.D. (2005). Genetic structure and history of population of the deep sea fish *Helicolenus dactyloptenus* (Delaroche,1809) inferred from mtDNA sequence analysis. Molecular Ecology, 14(5);1343-54.

10. Avise, J.C. (2004). Molecular markers, natural history, and evolution. Second Edition. Sinauer: Sunderland; MA; P. 421-435.

11. Al Abdessalaam, T.Z. (1995). Marine species of the Sultanate of Oman., Publication no 46/95. Muscat: Ministry of Agriculture and Fisheries; 1995.P;412-414.

12. Allendorf, F.W., Utter, F.M. (1979). Population genetics. In Fish Physiology (Hoar, W.S., Randall, D.J. & Brett, J.R., eds). Academic Press; New York; 8; 407-54.

13. Boore, J. L. (1999). Animal mitochondria lgenomes, Nucleic Acids Res, 27; 1767-1780.

14. Chen, Z.Z., Qin Y.S. (2003). Estimation of growth and mortality parameters of *Parargyrops edita* Tanaka in Beibu Bay. Journal of Fisheries of China, 27; 251-257.

15. Colgan, S., Obrian, L., Maher, M., Shilton, N., McDonnell, K., Ward, S. (2001). Development of a DNA- based assey for species

identification in meat and bone meal. Journal of Food Res. Hnt., 34; 409-414.

16. Darvishi, M., Behzadi, S., Salarpour, A. (1999). Survey of some aspects of king soldier bream (*Agryrops spinifer*) population dynamics in the waters of the Persian Gulf, Bushehr province. Scientific Information Center of JahadDaneshgahi, Iran. 21P .

17. Duda, T.F., Kohn, A.J., PalumbiS,R. (2001). Origins of diverse feeding ecologies within Conus, a genus of venomous marine gastropods. Biological Journal of the Linnean Society, 73; 391–409.

18. Grandcourt, E.M., Al Abdessalaam, T.Z., Francis, F., Al Shamsi, A.T. (2004). Biology and stock assessment of the Sparids, *Acanthopagrus bifasciatus* and *Argyrops spinifer* (Forsskål, 1775), in the Southern Arabian Gulf. Fisheries Research, 69; 7–20.

19. Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. Nucleic Acids Symp. Ser., 41; 95-98.

20. Hesp, A.S., Potter I.C., Hall N.G. (2004). Reproductive biology and protandrous hermaphroditism in *Acanthopagrus latus*. Environmental Biology of Fishes, 70;257-272.

21. Hebert, P.D.N., Cywinska, A.,Ball, S.L., Dewaard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society London, Series B, Biological Sciences, 270; 313-322.

22. Kaas, Q., Westermann, J.C., Craik, D.J. (2010). Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer.Toxicon, 55(8); 1491–1509.

23. Ketmaier, V., Bianco P.G., Durand, J.D. (2008). Molecular systematic, phylogeny and biogeography of roaches (Rutilus, Teleostei, Cyprinidae). Journal of Molecular Phylogenetics and Evolution, 49; 362-367.

24. Lorenz, F., Puillandre, N. (2015). Conus hughmorrisoni, a new species of cone snail from New Ireland, Papua New Guinea (Gastropoda: Conidae). European Journal of Taxonomy, 129; 1–15.

25. Niamaimandi, K., Arshad, A., Daud, S., Saed, R., Kiabi, B. (2007). Population dynamic of green tiger prawn, *Penaeus semisulcatus* (De Haan) in Bushehr coastal waters, Persian Gulf. Fisheries Research, 86(23);105-112.

26. Palumbi, S., Martin, R.A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L., Grabowski, G. (1991). The simple fool's Guide to PCR, Version 2. University of Hawaii Zoology Department, Honululu.

27. Puillandre, N., Lambert A., Brouillet, S., Achaz, G. (2012). ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. Molecular Ecology, 21; 1864–1877.

28. Randall, J.E. (1995). Coastal fishes of Oman. University of Hawaii Press, Honolulu, Hawaii, P.439.

29. Randall, J.E., Allen, G.R., Steene, R.C. (1997). Fishes of the great barrier reef and coral sea. University of Hawaii Press Honolulu: Hawaii; P;234-256.

30. Satoru, N., Yukio, I., Tetsuo, Y., Naoto, H. (2008). comprehensive phylogeny of the family Sparidae (Perciformes: Teleostei) inferred from mitochondrial gene analyses. Journal of Genes & Genetics. Syst, (2)84;153-170.

31. Saeidi, Z., Rezvani Gilkolaei, S., Soltani, M. (2015). Population genetic structure studies of Liza aurata based on mtDNA control region sequences analyses in the southern coasts of the Caspian Sea. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 16(4); 1341-1348.

32. Sommer, C., Schneider, W., Poutiers, J.M. (1996). FAO Species identification field guide for fishery purposes. The living marine resources of Somalia. FAO: Rome, .P;127-131

33. Shaw, J. (2000). Fisheries environmental management review Gascony. FisheriesEnvironmental Management Review, 1; 22-29.

34. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30; 2725-2729.

35. Talwar, P.K., Kacker, R.K. (1984). Commercial sea fishes of India. Zoological Survey of India, Calcutta., 997 P.

36. Thomas, M. O., Kent, E.C. (2001). A phylogeny of the fish family Sparidae (porgies) inferred from mitochondrial sequence data.

Journal of Molecular Phylogenetics and Evolution, 32 (2004); 425–434.

37. Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical transactions of the royal society, doi: 10.1098. Published online .

38. Welch, D.J., Ballagh, A., Newman, S.J., Lester, R.J., Moore, B., Herwerden, L., Horne, J. (2010). Defining the stock structure of northern Australia,s threadfin salmon species, FRDC project, NO. 2007/032
.

.

Molecular Phylogeny of King soldier bream (*Argyrops spinifer*) in the Persian Gulf and Oman Sea (BandarBoushehr, BandarAbbas , Bandar Chabahar)

Sh. Valipour[1], **P.GhavamMostafavi[1]**, M.h. Shahhosseiny[2], F. Kaymaram[3]
1.Department of Marine Science, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran.Iran. **mostafavi_pa@srbiau.ac.ir**
2.Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shahr-e-Ghods. Tehran.Iran.
3.Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
Received:2021.8.8 **Accepted: 2021.7.10**

Abstract

Inroduction & Objective: King soldier bream is one of the species of family Sparidae, which is commercially and ecologically very important in the Iranian waters of the Persian Gulf and Oman Sea. The species of this family are morphologically very similar to each other and they may be mistakenly known as another species. Therefore, molecular identification of them has to be considered.

Materials and Methods: In this study, the phylogenetic relationship of king soldier bream fish based on mitochondrial region(CO1) was investigated using DNA sequencing method. For this purpose, 90 samples were collected from the soft tissue of the caudal fin using Ammonium acetate, and its quantity and quality were determined by Spectrophotometry and Electrophoresis. Optimal DNA samples for Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequencing were examined. After gene amplification and sequencing, Bio Edit version 7.0.1, BLAST, MEGA 7.0.2 and DnaSP 5.10.01 software were used to draw phylogenetic trees.

Results: Based on the phylogenetic tree obtained from the sequences, king soldier bream was divided into two main branches in Bandar Abbas, Bandar Bushehr and Bandar Chabahar areas. All samples of the first branch showed a sister relationship with the second branch and all the samples of branches one and two showed sisterhood with samples KJ012292 and kJ012291 from the Gene Bank in Italy with 82, 67 and 86% accuracy.

Conclusion: The results can provide useful information on the conservation and management programs, for the preservation, revitalization, and resource of the population this valuable species.

Keywords: Genetic Structure, Phylogeny, King Soldier Bream, Persian Gulf, Oman Sea.