View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

بررسی ژنتیکی شوورت ماهی نقره ای *Sillago sihama* در آب‌های شمال خلیج فارس بر پایه توالی ژن سیتوکروم اکسیداز C زیر واحد I

امین اوجی فرد*[۱]، احمد شادی[۲]، الهه فاتح[۱]، سیدجواد حسینی[۳]

۱.گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر
۲.گروه زیست فناوری دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر
۳. گروه سلولی ملکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۲۸ تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۲۰

چکیده

خانواده شوورت‌ماهیان (Sillaginids) از راسته سوف‌ماهی‌سانان (Perciformes)، نامزد مناسبی برای آبزی‌پروری در مناطق مصبی و کم‌ژرف به شمار می‌روند. این خانواده دارای دست‌کم سه گونه در آب‌های خلیج فارس می‌باشد. بررسی ژنتیکی گونه غالب این خانواده، شوورت‌ماهی نقره‌ای *Sillago sihama* با استفاده از ژن COI مورد ارزیابی قرار گرفت. در این بررسی، تعداد ۱۰ نمونه از گونه مورد نظر از هر یک از سواحل استان بوشهر و استان هرمزگان صید، شناسایی ریخت‌شناختی و بررسی ملکولی گردید. استخراج DNA با استفاده از روش اصلاح شده CTAB انجام شد. جهت انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز از آغازگرهای جهانی FISH F1 و FISH R1 استفاده گردید. نتایج حاصل از تعیین توالی نشان داد که قطعه تکثیر شده، ۶۲۷ جفت باز طول دارد. نتایج BLAST نشان دهنده همانندی بالا به گونه شوورت-ماهی نقره‌ای بود، بنابراین داده‌های ملکولی منبطق بر رده‌بندی ریخت‌شناختی این گونه بود. فاصله ژنتیکی کلی بین نمونه‌های دو ناحیه مذکور بر اساس *Kimura 2- parameter*، با استفاده از نرم افزار مگا ۰/۰۲ محاسبه شد. ترسیم درخت فیلوژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) در مقابل برون گونه (*Acanthopagrus latus*) نشان داد نمونه‌های دو استان از همدیگر قابل تفکیک نیستند. با توجه به نتایج بدست آمده، نمونه‌های بررسی شده دارای تبادل ژنی بالا هستند و تمایز بالایی میان دو استان هرمزگان و بوشهر ندارند. بنابراین درباره گونه شوورت‌ماهی نقره‌ای نمی‌توان دو جمعیت مجزا را بر اساس داده‌های این بررسی در نظر گرفت.

واژگان کلیدی: بوشهر، هرمزگان، شوورت ماهیان، شناسایی ملکولی

*نویسنده مسئول، پست الکترونیک: oujifard@pgu.ac.ir

۱. مقدمه

وضعیت فعلی خلیج فارس نشان دهنده آسیب جدی است که بر اکوسیستم آبزیان و همچنین ذخایر وارد آمده است (Tchernia, 1980). امروزه شناسایی گونه‌ها و جمعیت‌های آبزیان از اهمیت زیادی برخوردار است، چرا که علاوه بر مدیریت صحیح و بهره‌برداری مناسب، موجب اجرای برنامه‌های اصولی جهت حفاظت از گونه-ها یا جمعیت‌های پر ارزش، بازسازی ذخایر و همچنین ایجاد تنوع در تکثیر و پرورش این موجودات خواهد شد.

یکی از ذخایر با ارزش شیلاتی موجود در خلیج فارس، ذخایر ماهیان وابسته به کف هستند که شوورت ماهیان از جمله‌ی این ماهیان می‌باشند. خانواده شوورت ماهیان (Sillaginidae) از راسته سوف‌ماهی‌سانان (Perciformes) زیرراسته (Percoidei) هستند. این ماهیان، ماهیانی با رفتار گله‌ای می‌باشند که تغذیه‌شان از بستر است و بیشتر گوشتخوارند. ساکن آب‌های کرانه‌ای، پهنه‌های شنی و گلی هستند و در مناطق کرانه‌ای دارای امواج نسبتاً شدید نیز زندگی می‌کنند. با توجه به اینکه سواحل به عنوان نوزادگاه این ماهیان به شمار می‌رود، تخریب سواحل منجر به در معرض خطر قرار گرفتن این گونه شده است.

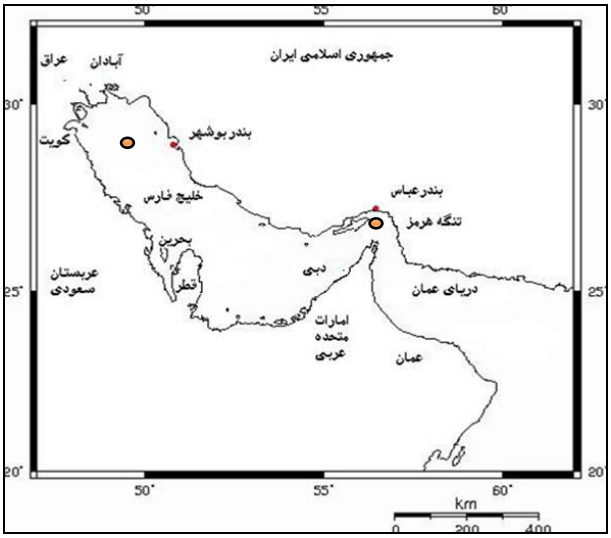
دی‌ان‌ای میتوکندریایی (mt DNA) بعنوان یک نشانگر مولکولی نیرومند برای تخمین روابط فیلوژنتیکی در گونه‌های مختلف بکار رفته است (García-Vázquez, 2006; Lakra *et al*., 2011; Ivanova *et al*., 2007; Aquilino, 2011). مولکول mt DNA در میتوکندری-های یاخته‌ای با رونوشت‌های فراوان و ساختار حلقوی وجود دارد. در ماهیان استخوانی mt DNA دارای نرخ جهش بالایی است (میانگین نرخ واگرایی ۲-۴٪ در میلیون سال) (Wilson *et al*., 1985) که منجر به نرخ تغییرات بالا در میان افراد می‌گردد. با توجه به این که دی‌ان‌ای میتوکندریایی بخشی است که بیشترین مطالعه روی آن صورت گرفته، توالی‌یابی ژنوم mt DNA از نشانگرهای برجسته، بویژه در جمعیت‌های هم‌گونه است (Gold *et al*., 1993; Park and Moran, 1995; Stepien, 1999; Stammatis *et al*., 2004; Dominguez *et al*., 2008). این علم جدید دارای اهمیت معنی‌داری در طبقه‌بندی سریع، دقیق و مطمئن گونه‌های متنوع موجودات زنده، از جمله شوورت ماهیان می‌باشد، زیرا شناسایی و جداسازی گونه‌های شوورت ماهیان بسیار مبهم و سخت است. دلیل اصلی آن شباهت بسیار زیاد در شکل و رنگ‌بندی در بین گونه‌هاست. بسیاری از گونه‌ها دارای رنگ مشابه و ریخت‌شناسی خارجی یکسان هستند (McKay, 1992). در خلیج فارس، نخستین گزارش شوورت ماهیان به گزارش Blegvad و Loppenthin در کتاب ماهیان خلیج فارس در سال ۱۹۴۴ باز می‌گردد. در این بررسی، شوورت ماهیان صید شده در خلیج فارس و دریای عمان همگی از گونه *Sillago sihama* معرفی شدند. Shadi و همکاران (۲۰۱۴) با مطالعه این ماهی در سواحل هرمزگان با بکارگیری نشانگرهای ریزماهواره، وجود گونه‌های مختلف را در شوورت ماهیان خلیج فارس مطرح نمود. دست‌کم سه گونه از شوورت ماهیان در خلیج فارس گزارش شده است (Shadi, 2014). یکی از گونه‌های موجود، شوورت ماهی نقره‌ای *Sillago sihama* می‌باشد.

امروزه ارزیابی ساختار جمعیتی و محافظت از ذخایر ژنی گونه‌های دریایی، به واسطه پیشرفت نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA امکان‌پذیر شده است (Campton, 2004; McAndrew, 2001). آنالیزهای مربوط به DNA میتوکندری روشی حساس و دقیق است که به منظور آشکار کردن تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌های یک گونه به کار برده می‌شود و می‌توان از آنها در رده‌بندی فیلوژنیک، تعیین درجه نزدیکی و شباهت ژنتیکی موجودات استفاده نمود (Avise, 2004;

Moritz *et al.*, 1994). اطلاعات مولکولی، به خصوص زمانیکه خصوصیات مورفولوژیکی برای تشخیص دقیق رده‌بندی گروه‌های تاکسونومیکی کافی نیست، بسیار سودمند است (Das *et al.*, 2008). نتایج بررسی‌های ژنتیکی می‌تواند اطلاعات پایه‌ای را در مورد جمعیت‌ها و گونه‌های موجود فرآهم آورد و در نتیجه منابع اطلاعات مهمی در اختیار مدیران شیلاتی و زیست-محیطی قرار می‌دهد. بر این اساس، با توجه به اهمیت شوورت ماهیان از دیدگاه بوم‌شناختی، و همچنین نقش آن بعنوان ذخایر شیلاتی و تاثیرگذاری آن در ماهیگیری ساحلی و خرده صیادی‌ها، هدف از این پژوهش، تائید رده‌بندی این گونه و همچنین در کنار آن، بررسی تنوع ژنتیکی آن در شمال خلیج فارس با استفاده از نشانگر مولکولی سیتوکروم اکسیداز (COI) می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از صیدگاه‌های استان بوشهر و استان هرمزگان توسط قلاب در تابستان ۱۳۹۳صورت گرفت.



شکل ۱) موقعیت منطقه نمونه‌برداری در سواحل شمالی خلیج‌فارس

در این بررسی، تعداد ۱۰ نمونه ماهی از مناطق مورد نظر در استان بوشهر و ۱۰ نمونه از استان هرمزگان جمع‌آوری شد و قطعه‌ای ۲ تا۳ گرمی از باله دمی هر نمونه، با ذکر محل نمونه‌برداری، بلافاصله در الکل ۹۶ درصد تثبیت و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات و پژوهش‌های دانشگاه خلیج فارس بوشهر منتقل گردید. استخراج DNA با استفاده از روش اصلاح شده CTAB انجام گرفت (Ausuble *et al.*, 1994). ژنوم استخراجی، پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، تا زمان انجام آزمایش‌های مربوط، در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگه‌داری شد. جهت سنجش کمیت و کیفیت DNA استخراجی، از دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ درصد استفاده گردید. برای تکثیر ژن سیتوکروم اکسیداز I میتوکندریایی، از یک جفت آغازگر به نام‌های FISHF1 با توالی 5´-ACCAAC CAC AAA GAC ATT GGC -3´AC و FISH R1 با توالی 5´- ACT TCT GGG TGG CCA AAGAATCA-3´ که توسط شرکت metabion international AG آلمان سنتز شده است، استفاده شد (Ward *et al.*, 2005). جهت انجام PCR و تکثیر ژن هدف، ۱۰۰نانوگرم از DNA استخراجی، ۱ میکرولیتر از آغازگرها (۱۰پیکومول) به همراه ۰/۸میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۰/۲میکرولیتر Taq(5u/µ)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار) استفاده شد و در نهایت حجم آن با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه دستگاه ترمال سایکلر (مدل Corbett –bCG 96-شرکت Bio-RAD) بصورت Toch down با ۳۰ چرخه تعیین شد. ۸ چرخه اول شامل واسرشته‌سازی (Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال (Annealing) در دمای ۶۵-۵۵ درجه سانتی‌گراد و گسترش (Extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه و ۲۲ چرخه باقی مانده نیز

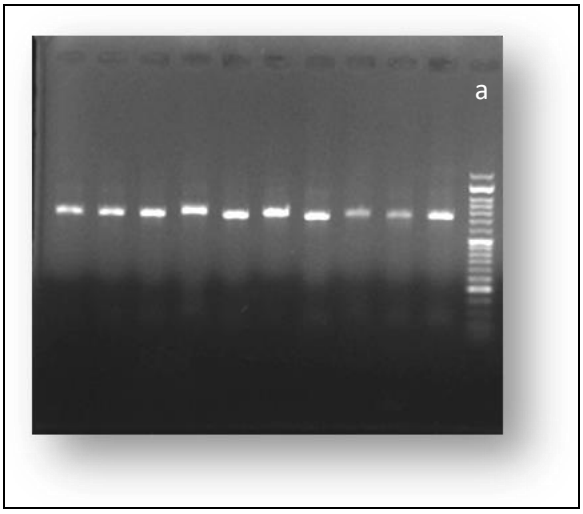
به ترتیب شامل واسرشته‌سازی (Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال (Annealing) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و بسط (Extension) دردمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. یک مرحله واسرشته‌سازی (Denaturation) اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه نیز انجام شد. مقدار ۴۵ میکرولیتر از محصولات PCR به همراه مقداری از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت، به منظور تعیین توالی به شرکت فزاپژوه ارسال شدند. این نمونه‌ها به روش اتوماتیک سانجر توسط دستگاه ABI3730XL در شرکت Sequepech از آمریکا توالی یابی گردیدند.

از ابزار BLAST در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی توالی استفاده گردید. جهت تجزیه و تحلیل آماری و محاسبه تنوع نوکلئوتیدی یا هاپلوتایپی بین افراد یا گروه‌ها از نرم افزار (Tamura *et al.*, 2007) MEGA ver 5 و DNAsp Ver. 5 استفاده شد.

برای تحلیل داده‌های مولکولی کروماتوگرام‌های به دست آمده از توالی‌یابی، نرم افزار Bio (Hall, 1999) Edit ever 7.0 مورد استفاده قرار گرفت و توالی‌های مورد نظر توسط برنامه Clustal (Larkin *et al.*, 2007) w همردیف گردیدند. داده‌های همردیف شده با پیوند همجواری[2] و روش جفت گروه غیروزنی از روش میانگین حسابی[3] تعبیه شده در نرم افزار MEGA ver 5 (Tamura *et al.*, 2007) تحلیل شدند و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده نرم افزارهای SPSS و Excel انجام گرفت.

۳. نتایج

استخراج DNA از همه نمونه‌ها با موفقیت صورت گرفت و نتایج ارزیابی نشان داد که محصول استخراجی از کیفیت و کمیت مناسبی برخوردار است. شکل ۲ الگوی حرکتی محصول PCR نمونه‌ها را بر روی ژل آگارز ۱ درصد نشان می‌دهد.



شکل ۲) نمونه محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد: a) خط-کش ملکولی ۵۰bp

نتایج حاصل از تعیین توالی محصول فوق نشان داد که قطعه تکثیر شده از نمونه‌ها ۶۲۷ جفت باز طول دارد. نتایج مقایسه و همردیفی توالی‌ها با استفاده از Clustal W نشان دهنده وجود ۳۵ مکان پلی‌مورفیک بود. تعداد کل جهش‌ها نیز ۳۶ عدد محاسبه شد. نتایج حاصل از بررسی توالی‌ها، ۳ هاپلوتایپ را در بوشهر و ۴ هاپلوتایپ را در هرمزگان نشان داد که ۱ هاپلوتایپ در هر دو جمعیت مشترک بود. تنوع هاپلوتایپی (Hd) نیز در هر کدام از جمعیت‌های بوشهر و هرمزگان برابر با ۱ بود و تنوع هاپلوتایپی کل ۰/۹۵ بدست آمد. تنوع نوکلئوتیدی (Pi) نیز در جمعیت بوشهر برابر با ۰/۰۱ و در جمعیت هرمزگان ۰/۰۲ بود و تنوع نوکلئوتیدی کل ۰/۰۱۹ محاسبه شد. R که شاخص نسبت transition به transversion است، در بررسی حاضر ۷/۴ محاسبه شد. میانگین ترکیب بازی به ترتیب، برای (A): ۹/۰٪، ۲۲٪، (T):

[2] Neighbor Joining
[3] Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

۳۰/۷٪، (C): ۲۸/۹٪ و (G): ۱۷/۵٪ بود. محتوای G+C نیز برابر ۴۶/۷ درصد محاسبه شد (جداول ۱ و ۲).

	G	A	C	T(U)	
بوشهر	۱۷/۴	۲۲/۶	۲۹/۴	۳۰/۶	۶۲۸
هرمزگان	۱۷/۶	۲۲/۵	۲۹/۱	۳۰/۷	۶۳۰
مجموع	۱۷/۵	۲۲/۹	۲۸/۹	۳۰/۷	۶۲۷/۳

جدول۱) درصد نوکلئوتیدهای مختلف در نمونه‌های بررسی کنونی

	همه نمونه‌ها	استان بوشهر	استان هرمزگان
شمار جایگاه‌های نوکلئوتیدی	۶۲۷	۶۲۶	۶۲۸
جایگاه‌های پلی‌مورف	۳۵	۱۲	۳۰
تعداد کل جهش‌ها	۳۶	۱۲	۳۰
تعداد هاپلوتایپ‌ها	۶	۳	۴
تنوع هاپلوتایپی	۰/۹۴	۰/۹۵	۰/۹۷
pi تنوع نوکلئوتیدی	۰/۰۱۹	۰/۰۱۲	۰/۰۲۳
GC نسبت	٪۴۶/۷	٪۴۶/۸	٪۴۶/۷۵

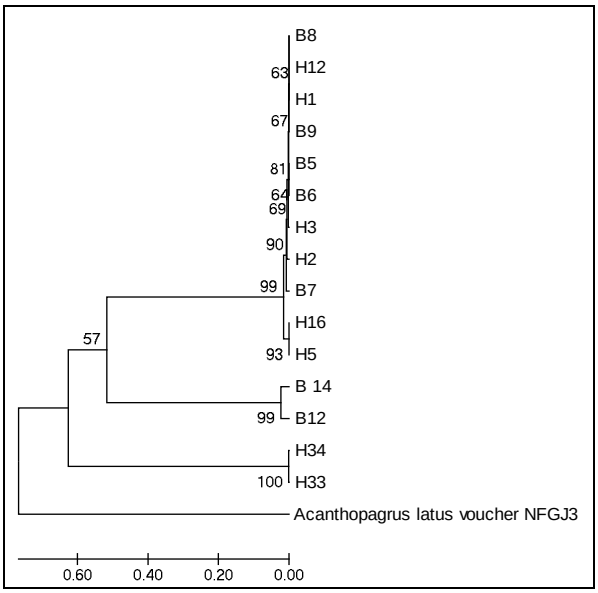
جدول۲) اطلاعات ژنتیکی نمونه‌ها، جایگاه‌های نوکلئوتیدی، پلی‌مورف،تنوع نوکلئوتیدی و. غیره در بین نمونه‌های استان بوشهر و هرمزگان

با مقایسه توالی‌های مورد بررسی با توالی‌های ثبت شده در پایگاه NCBI، مشخص شد که نمونه‌های مورد بررسی، دارای همپوشانی ۹۸٪ و همانندی ۹۵٪ با توالی‌های گونه *Sillago sihama* هستند.

تمایز ژنتیکی (Fst) و جریان ژنی (Nm) (Hudson *et al.*, 1992) بین نمونه‌های استان بوشهر و هرمزگان، به ترتیب ۰/۰۸ و ۲/۸۵ محاسبه شد. میانگین فاصله ژنتیکی درون‌گروهی (Kimura-2-Parameter) با کاربرد نرم افزار Mega 5.1 محاسبه گردید (Tamura *et al.*, 2007). براساس نتایج بدست آمده، فاصله ژنتیکی در کل نمونه‌ها برابر با ۰/۰۲ بود. همچنین میانگین فاصله ژنتیکی برای نمونه‌های استان بوشهر ۰/۰۱ و استان هرمزگان ۰/۰۲۸ بدست آمد. درخت‌های فیلوژنتیکی با پشتوانه تکرار ۵۰۰ (Bootstrap 500) به روش پیوند همجواری (NJ) و روش جفت گروه غیر وزنی از روش میانگین حسابی (UPGMA) ترسیم شد (شکل۳).

۴. بحث و نتیجه گیری

شوورت ماهیان، ماهیانی کفزی هستند و از بستر صید می‌شوند. این ماهیان، نامزد مناسبی برای آبزی‌پروری در مناطق مصبی و کم‌عمق به شمار می‌روند (Mckay, 1992). ماهی شناسان رده‌بندی‌های گوناگونی برای این ماهیان ارائه کرده‌اند اما ناسازگاری‌هایی در مورد جایگاه این خانواده وجود دارد که آن را می‌توان به دلیل نبود درک کامل از روابط تکامل نژادی دانست که می‌تواند پایه اساسی برای طبقه‌بندی آنها را فراهم آورد. در پژوهشی که Shadi (۲۰۱۴) با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره و توالی یابی ژن srRNA ۱۶ بر روی شوورت ماهی انجام داد، وجود گونه‌های مختلف از این خانواده در خلیج فارس را اعلام نمود، همچنین بررسی کاملتری در این زمینه انجام شده است (در حال چاپ). Hebert و همکاران (۲۰۰۳) پیشنهاد دادند که از COI به عنوان بارکد برای تشخیص گونه‌ها استفاده شود. تاکنون مطالعات زیادی بر مبنای این ژن به منظور بارکد ماهیان صورت گرفته است. خوشبختانه در این پژوهش نیز، میزان تنوع ژنتیکی در استان بوشهر و هرمزگان به خوبی توسط این ژن نمایان شد. در این پژوهش، تعداد و تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی در هر دو جمعیت بوشهر و هرمزگان، از هر دو، جمعیتی با پویایی بالا به نمایش گذاشت.



شکل۳) درخت فیلوژنتیکی نمونه‌های این پژوهش به روش پیوند همجواری (NJ) با برون‌گونه *Acanthopagrus latus*

Ward و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی خود میانگین نسبت GC را در سیتوکروم اکسیداز زیر واحد ۱ در ۱۴۳ گونه ماهی استخوانی[4] ۴۷/۱٪ و در بین ۶۱ گونه از ماهیان غضروفی ۴۲/۲٪ بدست آوردند که نسبت GC در بین سفره ماهی‌ها بیشتر از کوسه‌ماهیان بود (۴۷/۱٪ و۴۲/۲٪). در پژوهشی دیگر، Kruck و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از سیتوکروم اکسیداز (۱) درصد نوکلئوتیدهای مختلف را در گونه *Sillago ciliate* به صورت A: ۲۳/۵٪، C: ۲۸/۵٪، G: ۱۹/۳٪ و T: ۲۸/۷٪ محاسبه کردند که نسبت GC برابر با ۴۷/۸٪ بود. در بررسی حاضر نیز نسبت GC در نمونه‌های بوشهر ۴۶/۸٪ و در نمونه‌های هرمزگان برابر با ۴۶/۷۵٪ بدست آمد و میانگین این نسبت ۴۶/۷٪ محاسبه شد که به میانگین معین شده توسط Ward و همکاران (۲۰۰۵) نزدیک بود. هر چه نسبت GC یک گونه بیشتر باشد آن گونه اجدادی‌تر است (Rodriguez *et al.*, 2000).

شاخص Fst بیانگر میزان تمایز ژنتیکی جمعیت‌ها در سطوح مختلف است. مقدار Fst همیشه مثبت است و بین صفر (هیچ زیر جمعیتی وجود ندارد) تا یک (وجود زیرجمعیت و جدایی کامل جمعیت‌ها) متغیر است.
زمانی که Fst بیشتر از ۰/۲۵ باشد، نشان‌دهنده تمایز خیلی بالا و جدایی کامل جمعیت‌ها از یکدیگر می‌باشد. اگر بین صفر تا ۰/۰۵ باشد تمایز ژنتیکی پایین، بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵، تمایز متوسط و بیشتر از ۰/۱۵تمایز بالا را نشان می‌دهد (Wright, ۱۹۷۸). معمولا بررسی‌های ژنتیکی در خلیج فارس تمایز زیادی را بین نمونه‌های خلیج فارس نشان نمی‌دهد (Abedi *et al.*, 2011; Shadi *et al.*, 2014; Tajan *et al.*, 2016). در این پژوهش نیز مقدار Fst بین نمونه‌های استان بوشهر و هرمزگان برابر ۰/۰۸ بدست آمد که تمایز متوسطی را بین نمونه‌های این دو استان نشان می‌دهد. مقدار جریان ژنی (Nm) نیز بالا و برابر ۲/۸۵ بود. نتایج حاصله نشان دهنده وجود مهاجرت و تبادل ژنی بالا بین دو ناحیه مذکور است که می‌توان علت را همجوار بودن دو استان و نبود موانع جغرافیایی عنوان نمود.
مقایسه نمونه‌ها بر مبنای فاصله ژنتیکی، بین نمونه‌های بررسی حاضر و دیگر گونه‌های شوورت ماهیان (جدول۳) نشاندهنده این بود که فاصله ژنتیکی از صفر تا ۰/۲۶۰ متغیر است. با توجه به گزارش Shaklee و همکاران (۱۹۸۲) و Thrope و همکاران (۱۹۹۴)، که فاصله ژنتیکی را برای جمعیت‌های هم‌گونه، به طور میانگین (۰/۰۰۲-۰/۰۷) و برای گونه‌های هم‌جنس به طور میانگین (۰/۰۳-۰/۶۱) عنوان کرده‌اند، می‌توان نتیجه گرفت که فاصله ژنتیکی بدست آمده بین نمونه‌های دو منطقه، در دامنه جمعیت‌های هم‌گونه است.
درختان فیلوژنیک مسیرهای تکاملی را نشان می‌دهند و می‌توان از آنها برای درک روابط تکاملی، بهره جست.

[4] Teleost

جدول۳) فواصل ژنتیکی بین هاپلوتایپ‌های نمونه‌های مورد نظر در این پژوهش با برخی گونه‌های همجنس بر پایه معیار Kimura 2- parameter (Kimura, 1980) . ستون‌های مورب پائین فاصله ژنتیکی میان نمونه‌ها و ستون مورب بالا انحراف معیار هر فاصله ژنتیکی را نشان می‌دهد.

	B6	S-c	S-m	S-ch	S-j	S-p	S-s-F	S-s-G	S-s-P	S-a	S-b	S-ae	B7	B8	H1	H2	H3	H5
B6		0.031	0.033	0.036	0.032	0.040	0.036	0.044	0.045	0.031	0.034	0.030	0.005	0.002	0.002	0.004	0.002	0.009
Sillago_ciliata_voucher_BW-A1510	0.192		0.023	0.036	0.038	0.037	0.034	0.039	0.037	0.000	0.028	0.022	0.031	0.031	0.031	0.030	0.030	0.028
Sillago_maculata_haplotype3	0.203	0.145		0.035	0.038	0.038	0.036	0.042	0.033	0.023	0.029	0.014	0.032	0.033	0.033	0.034	0.033	0.030
Sillago_chondropus_voucher_ADC198	0.224	0.229	0.218		0.035	0.042	0.039	0.046	0.038	0.036	0.046	0.038	0.039	0.036	0.036	0.037	0.037	0.039
Sillago_japonica_isolate_JRZ3	0.191	0.239	0.233	0.216		0.040	0.034	0.041	0.037	0.038	0.034	0.037	0.031	0.032	0.032	0.031	0.031	0.030
Sillago_parvisquamis_isolate_COI3	0.231	0.221	0.238	0.255	0.239		0.037	0.042	0.030	0.037	0.038	0.038	0.039	0.040	0.040	0.040	0.040	0.038
Sillago_sihama_voucherF91	0.217	0.222	0.220	0.243	0.219	0.218		0.035	0.038	0.034	0.037	0.035	0.036	0.035	0.035	0.036	0.036	0.036
Sillago_sihama_voucher_GF779	0.258	0.238	0.254	0.282	0.247	0.247	0.204		0.045	0.039	0.041	0.041	0.044	0.043	0.043	0.044	0.044	0.041
Sillago_sinica_isolate_PKU_2043	0.262	0.228	0.195	0.229	0.230	0.175	0.225	0.262		0.037	0.039	0.035	0.044	0.045	0.045	0.044	0.045	0.040
Sillago_analis_isolate_HI09-SA27	0.192	0.000	0.145	0.229	0.239	0.221	0.222	0.238	0.228		0.028	0.022	0.031	0.031	0.031	0.030	0.030	0.028
Sillago_bassensis_haplotype4	0.217	0.174	0.176	0.274	0.215	0.237	0.234	0.249	0.237	0.174		0.030	0.034	0.034	0.034	0.033	0.034	0.031
Sillago_aeolus_haplotype3	0.190	0.137	0.075	0.232	0.226	0.225	0.217	0.249	0.202	0.137	0.194		0.030	0.031	0.031	0.030	0.030	0.027
B7	0.016	0.197	0.197	0.237	0.192	0.226	0.217	0.258	0.254	0.197	0.212	0.188		0.006	0.006	0.007	0.006	0.010
B8	0.002	0.194	0.203	0.221	0.194	0.234	0.214	0.256	0.260	0.194	0.220	0.192	0.018		0.000	0.005	0.003	0.010
H1	0.002	0.194	0.203	0.221	0.194	0.234	0.214	0.256	0.260	0.194	0.220	0.192	0.018	0.000		0.005	0.003	0.010
H2	0.011	0.188	0.211	0.232	0.188	0.226	0.222	0.263	0.258	0.188	0.213	0.191	0.028	0.013	0.013		0.003	0.008
H3	0.004	0.187	0.207	0.229	0.191	0.226	0.222	0.264	0.260	0.187	0.212	0.190	0.020	0.005	0.005	0.007		0.009
H5	0.038	0.172	0.187	0.239	0.185	0.210	0.224	0.252	0.229	0.172	0.197	0.170	0.044	0.040	0.040	0.030	0.034	

به عبارت دیگر، هرچه موجودات مورد بررسی شباهت بیشتری با مولکول‌های توارثی داشته باشند، خویشاوندی نزدیکتری دارند. در این بررسی، نمونه‌های دو استان به طور مختلط در یک خوشه کلی قرار گرفتند و نمی‌توان خوشه‌های جداگانه‌ای برای هر استان در نظر گرفت. این مسئله، بیانگر این است که بر پایه اطلاعات به دست آمده از این بررسی، نمی‌توان جمعیت‌های مجزایی برای دو استان مشاهده نمود و نمونه‌های فوق، با هم قرابت و جریان ژنی بالایی دارند، هر چند پیشنهاد می‌گردد بررسی‌های بیشتری با تعداد نمونه بیشتر و ژن‌های مختلفی در این باره صورت گیرد.

منابع

Abedi, E., Zolgharnein, H., Salari, M.A., Mohamadi, M., Ghasemi, A., Archangi, B. and Mirza, R. 2011. Study of genetic diversity of Scomberomorus comerson using microsatellite markers in Persian Gulf. Journal of Marine Science and Technology. 9(4):83-89

Aquilino S V L., Tango J M., Fontanilla I K C., Pagulayan R C., Basiao Z U., Ong P S. and Quilang J P. 2011. DNA barcoding of the ichthyofauna of Taal Lake, Philippines. *Molecular Ecology Resources*. 11: 612–619

Ausubel F M., Brent R., Kingston R E., Moore D D., Seidman J G., Smith J A., and Struhl K. 1994. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York City. NY: 201-214.

Blegvad H., and Loppenthin B. 1944. Fishes of the Iranian Gulf. Danish Scientific Investigations in Iran, (3), Einar Munksgaard, Copenhagen, 247 pp.

Avise J.C. 2004. Molecular markers, natural history and evolution. Sinauer: Sunderland, Massachusetts. 684pp.

Campton D.E. 2004. "Sperm competition in salmon hatcheries: the need to institutionalize genetically benign spawning protocols". *Transactions of the American Fisheries Society*. 133(3): 1277-1289.

Das I.K., Fakrudin B., and Arora D.K. 2008. "RAPD cluster analysis and chlorate sensitivity of some indian isolates Macrophomina phaseolina from sorghum and their relationship with pathogenicity". *Microbical Research*. 163: 215-224.

Dominguez O.D., Alda F., Perez-Ponce de Leon G., García- Garitagoitia J.L. and Doadrio I. 2008. Evolutionary history of the endangered fish Zoogoneticus quitzeoensis (Bean 1898) (Cyprinodontiformes: Goodeidae) using a sequential approach to phylogeography based on mitochondrial and nuclear DNA data. BMC *Evolutionary Biology*. 8(161): 1-19.

Garcia-Vazquez, E., Alvarez P., Lopes P., Karaiskou N., Pérez J., Teia A., Martinez J.L., Gomes L and Triantaphyllidis C. 2006. PCR-SSCP of the 16S rRNA gene, a simple methodology for species identification of fish eggs and larvae. *Scientica Marina* 70(Suppl 2):13–21

Gold J.R., Richardson L.R., Furman C. and King T.L. 1993. Mitochondrial DNA differentiation and population structure in red drum (*Sciaenops ocellatus*) from the Gulf of Mexico and Atlantic Ocean. *Marine Biology*. 116: 175-18.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98.

Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., and deWaard J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceeding of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 270: 313–322.

Hudson R.R., Slatkin M., and Maddison W.P. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*. 132(2):583-9.

Ivanova N.V and Zemlak T.S., Hanner RH and Hebert P.D.N. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. Molecular *Ecology Notes*. 7:544–548

Kruck N.C., Tibbetts I.R., Ward R.D., Johnson J.W., Loh W.K.W. and Ovenden J.R. 2013 . Multi-gene barcoding to discriminate sibling species within a morphologically

difficult fish genus (silage). *Fisheries Research*. 143: 9-46

Lakra W. S., Verma M. S., Goswami M., Lal K. K., Mohindra V., Punia P., Gopalakrishnan A., Singh K.V., Ward R.D. and and Hebert P. 2011. DNA barcoding Indian marine fishes. *Molecular Ecology Resources*. 11: 60–71.

Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., and Higgins D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0 *Bioinformatics*. 23: 2947-2948

McAndrew B. 2001. "Rapid genetic improvement in aquaculture in: Coimbera, J. (Ed), Modern aquaculture in the Coastal Zone-Lessons and Opportunities". IOS Press: Amsterdam, Netherlands. 212-230 p.

McKay R.J. 1992. Sillaginid fishes of the world. (Family Sillaginidae). An Annotated and Illustrated catalogue of the Sillago, Smelt or Indo-Pacific Whiting Species Known to Date. FAO. Fisheries Synopsis. 125: 14, 87 p.

Moritz C. 1994. "Defining 'evolutionary significant units' for conservation". *Trends in Ecology and Evolution*. 9(10): 373–375.

Tajan M N., Ghasemi S A. and Gharibkhani M. 2016. Population genetic diversity of Otolithes ruber in Persian Gulf and Oman sea by sequencing miochonrial 16s rRNA gene. *Journal of Marine Biology*(in Persian).8(3): 1-12

Park L., Moran P., and Dightman D. 1995. A polymorphism in intron D of the chinook salmon growth hormone 2 gene. *Animal Genetics*. 26: 285-285

Rodriguez C.R., Cho E.J, Keogh M.C., Moore C.L., Greenleaf A.L., and Buratowski S. 2000. Kin28, the TFIIH-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II. *Molecular and Cellular Biology*. 20(1):104-12

Shadi, A. 2014. Morphologic and Genetic Differentiation of Sillaginids from North Persian Gulf. Ph.D. thesis. Khoramshahr University of Marine Science and Technology. 123pp

Shadi, A., Zolgharnein, H., Salari-aliabadi, M., Nabavi, M., Ronagh, M. 2014. Genetic characterization of Sillago sp. from Hormozgan coastal waters using microsatellite arkers. Journal of Marine Science and Technology. 13(2), 1-10.

Shaklee J. B., Tamaru C.S. and Waples, R.S. 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoretic analysis of proteins. *Pacific Science*. 36: 141-157.

Stammatis C., Triantafyllidis A., Moutou A. and Mamuris Z. 2004. Mitochondrial DNA variation in Northeast Atlantic and Mediterranean populations of Norway lobster, Nephrops norvegicus. *Molecular Ecology*. 13: 1377 – 1390.

Stepien C.A. 1999. Phylogeographical structure of Dover sole Microstomus pacificus: the larval retention hypothesis and genetic divergence along the deep continental slope of the northeastern Pacific Ocean. *Molecular Ecology*. 8: 923-939.

Tamura K., Dudley J., Nei M., and Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599.

Thorpe J.P. and Sol-cava A.M. 1994. The use of allozyme electrophoresis in vertebrate systematics. *Zoologica scripta*. 23: 3-18

Ward, R.D., Zemlak T.S., Innes B.H., Last P.R. and Hebert P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological*. 360(1462):1847-57.

Wilson A.C., Cann R.L., Carr S.M., George M., Gyllensten U.B., Helm-Bychowski K.M., Higuchi R.G., Palumbi S.R., Prager E.M., Sage R.D. and Stoneking M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of Linnaean Society*. 26: 375–400.

Wright S. 1987. Evolution and the genetics of populations, vol. 4: variability within and among natural populations. University of Chicago Press Chicago. 584pp.

Yavarmoghadam, H., Zolgharnein, H., Salari Aliabadi, M., Keyvan, S. and Modarresi, M. 2017. Assay of Genetic diversity of cuttlefish (Sepia pharaonis ;Ehrenberg, 1831) populations using microsatellite markers in Bandarabass and Bushehr regions. Journal of Marine Science and Technology. 16(2), 1-7.

Genetic Analysis of Sand Whiting *Sillago sihama* from North Persian Gulf based on Cytochrome Oxidase C subunit I sequences

Amin Oujifard[*1], Ahmad Shadi[2], Elaheh Fateh[1], Seyed Javad Hosseini[3]

1. Department of Fisheries, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Persian Gulf University. Bushehr.
2. Department of Marine Biotechnology, Faculty of Marine Science and Technology, Persian Gulf University. Bushehr.
3. Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Science, Persian Gulf University. Bushehr.

Abstract:

Silaginidae family fish from Perciforms, are appropriate candidates for shallow water and coastal aquaculture. At least three species of this family represents in the Persian Gulf. Genetic analysis of Sand whiting *Sillago sihama* , the most common species of family performed using COI gene. During the present study 10 samples were collected from Bushehr and Hormozgan provinces coastal waters. DNA extracted by modified CTAB method. Polymerase chain reactions were performed using universal primers - FISHF1 and FISHR1-. Sequencing results showed a 627 bp amplified fragment. Performing BLAST supported high identity to Sillago sihama species, hence morphometric identification confirms molecular barcoding. Genetic distance of 0.02 was calculated between samples of two areas based on Kimura 2- parameter using Mega software. Constructed phylogenetic tree using neighbor joining method whereas the *Acanthopagrus latus* sequences was used as an outgroup revealed no differentiation between two stations samples. In conclusion based on the results of the present study, the gene flow was high among studied samples and no significant differentiation was observed between Bushehr and Hormozgan samples. In conclusion no discrete populations differentiated based on the results of the present study.

Keywords: Bushehr, Hormozgan, Sanding, Molecular identification

Figure1. Sampling location in the Northern Persian Gulf
Figure2. PCR product sample on 1% agarose gel: a=50bp molecular marker
Figure3. Phylogenetic tree of the study samples based on neighbor joining method and *Acanthopagrus latus* as outgroup
Table 1. Nucleotide composition in samples of the present study
Table 2. Genetic data of samples, nucleotide position, polymorphism, nucleotide polymorphism etc. between Boushehr and Hormozgan samples
Table 3. Genetic distances between haplotypes of the studied species and other congeneric species based on Kimura 2- parameter (Kimura, 1980)

[*] Corresponding author E-mail: oujifard@pgu.ac.ir