مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت ماهی راشگو معمولی (*Eleutheronema tetradactylum*) در خلیج فارس و دریای عمان به روش توالی یابی ژن 28S rRNA

هدی خالدی[۱]، سهراب رضوانی‌گیل‌کلایی[۲]، حسین ذوالقرنین[۳]، احمد سواری[۴] و علیرضا صفاهیه[۳]

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۰/۴/۶

خلاصه

در این مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی راشگو معمولی در خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از روش تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، ۴۱ نمونه از چهار منطقه خوزستان، بوشهر، بندرعباس و سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شد. DNA با استفاده از روش فنل- کلروفرم استخراج گردید. آغازگرهای جلودار و برگشتی جهت تکثیر ژن ۲۸S rRNA ماهی راشگو طراحی شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بر روی DNA استخراجی انجام شد. نمونه‌ها به صورت یک طرفه تعیین توالی شده و پس از همترازی توالی‌ها، آنالیز توسط بسته‌های نرم‌افزاری Arlequin $ver_{3.5}$, Dnasp ver_5 و MEGA Ver_4 انجام گردید. بیشترین تعداد و تنوع هاپلوتیپی ونوکلئوتیدی در جمعیت بندرعباس مشاهده شدند و کمترین مقدار شاخص‌های مذکور در جمعیت بوشهر ثبت گردیدند. بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت بوشهر و بندر عباس (۰/۲۹) و کمترین بین بوشهر و چابهار (صفر) مشاهده گردید. واگرایی جمعیتی بین جمعیت‌های خوزستان و چابهار بیشترین مقداربود (۰/۷۱) و بین جمعیت‌های بوشهر و چابهار کمترین مقدار (۰/۰۵) بدست آمد. فراوانی هاپلوتیپ‌ها بین جمعیت‌های بوشهر و بندرعباس (۱۲/۳۷)، همچنین بوشهر و خوزستان (۷/۹۴) معنی‌دار بود. تعداد و تنوع هاپلوتیپ‌های بین جمعیت‌ها نیز محاسبه شد و بیشترین مقدار بین جمعیت‌های خوزستان و بندرعباس و کمترین بین بوشهر و چابهار ثبت گردید. بر اساس تجزیه و تحلیل‌های حاصل، می‌توان عنوان نمود که جمعیت بوشهر از جمعیت‌های قدیمی محسوب می‌شود لذا به ثبات ژنتیکی رسیده است اما در دیگر جمعیت‌ها پویایی و ارتباط ژنتیکی درون و میان جمعیتی قابل قبولی دیده می‌شود. با رسم درخت فیلوژنی به روش نزدیک‌ترین همجواری (NJ)، همه افراد جمعیت‌ها در یک کلاستر قرار گرفتند و در مقابل، برون‌گونه (out group) در کلاستری دیگرجای گرفت.

کلمات کلیدی: ماهی راشگو معمولی، توالی یابی، ساختار ژنتیکی جمعیت، خلیج فارس، دریای عمان

مقدمه

امروزه جمعیت ماهیان تجاری در اکثر اکوسیستم‌های جهان از جمله خلیج فارس و دریای عمان به علت صید غیر مجاز، به شدت کاهش یافته است. تکثیر طبیعی ذخایر باقیمانده هم به جهت تخریب بسترهای تخم‌ریزی، فشار صید بالا و آلودگی به سختی انجام می‌گیرد.

راشگو معمولی *Eleutheronema tetradactylum* (Shaw,1804) متعلق به خانواده Polynemidae است که در آب‌های ساحلی و کدر زیست می‌کند. انتشار آن از خلیج فارس، در جنوب و جنوب شرقی آسیا تا Papua در گینه نو و شمال استرالیا است (۱۴). این ماهی که از

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریائی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر E-mail: Hodakhaledi@Yahoo.com (نویسنده مسئول)

[۲] دانشیار موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران

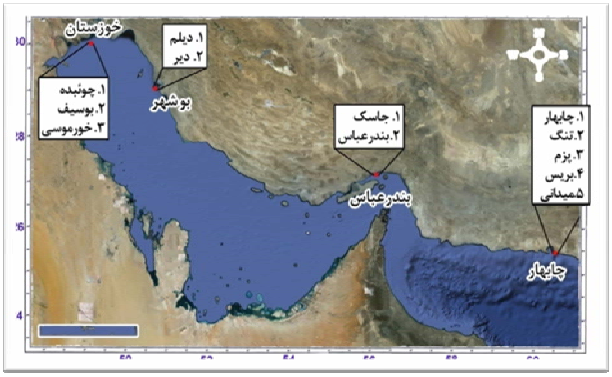
[۳] استادیار گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم‌دریایی، دانشگاه علوم و فنون‌دریایی خرمشهر

[۴] استادگروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

گونه‌های بسیار بازار پسند است، نقش بسزایی در تامین غذای سالم دارد (۱۲)، اما علی‌رغم اینکه در ردیف اولین گونه‌های مهم اقتصادی و صنعت شیلات قرار دارد (۲۴)، اطلاعات جامعی در خصوص بیولوژی، ذخایر و جمعیت‌های آن وجود ندارد (۲۴). راشگو از جمله ماهیان در معرض خطر معرفی شده است (۱۴). لذا مطالعه ساختار جمعیتی، اکولوژیک و بیولوژیک آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۲۱). بررسی ساختار جمعیتی و تشخیص زیر گونه‌ها در آبزیان، توسط روش‌های مختلفی انجام می‌گیرد که از جمله می‌توان به مطالعه تاریخچه زندگی، ریخت‌شناسی، نسبت ایزوتوپ‌ها در اتولیت (۱۸)، نشانه‌گذاری (۵) و در نهایت شناسایی مولکولی و ژنتیکی اشاره کرد. در سال‌های اخیر استفاده از شیوه‌های گوناگون مطالعات ژنتیکی به روشی استاندارد و مطمئن در مطالعات پویایی جمعیت‌های آبزیان مبدل شده است. Martin cesar و همکاران در سال ۲۰۰۳ با بکارگیری توالی یابی مستقیم ژن D-loop میتوکندریایی ماهی *Leporinus elongates* در برزیل، جمعیت‌های آن را مشخص نموده‌اند (۱۱). Aboim و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از توالی یابی ژن D-loop و cyt b ماهی *Helicolenus dactylopterus* در شمال آتلانتیک، به مطالعه جمعیت‌های ماهی مذکور پرداخته است (۲). Welch و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ با استفاده از توالی یابی ژن COI ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی *E. tetradactylum* و *P.macrochir* را در آب‌های استرالیا بررسی کرده است (۲۴). ماهیان آب‌های ساحلی و مصب‌ها بر خلاف ماهیان آب‌های عمیق و آزاد، ساختار ژنتیکی ویژه‌ای را از خود به نمایش می‌گذارند (۴). لذا پراکنش آنها بسیار متأثر از عوامل محیطی است و جهت حفاظت و برداشت پایدار نیاز به مدیریت، در تمامی سطوح، از مراحل ابتدایی رشد تا مولدین دارند (۲۴). در این تحقیق، ژن ۲۸S rRNA ماهی راشگو تعیین توالی شد. این ژن که از روی rDNA کپی برداری می‌شود، به علت وجود چند کپی از توالی‌های تکرار شونده در rDNA مبنای تفاوت‌های گسترده میان گونه‌ها و جمعیت‌ها و افراد است و به عنوان شاخصی با کارایی بالا در مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها به کار می‌رود (۱۷). هدف از این تحقیق بررسی ساختار جمعیتی و تنوع زیستی ماهی راشگو معمولی است که یکی از بازار پسندترین ماهیان خلیج فارس و دریای عمان است و می‌تواند به شناسایی بیشتر ذخایر این ماهی و احیاء و افزایش آنها، کمک شایانی نماید. همچنین این مطالعه می‌تواند در مدیریت برداشت پایدار، حفظ تنوع زیستی و تکثیر و پرورش ماهی مذکور نقش بسزایی داشته باشد و در گامی فراتر به عنوان الگو و مرجعی جهت مدیریت ذخایر دیگر ماهیان آب‌های ساحلی نیز از آن استفاده نمود (۲۳).

مواد و روش کار

نمونه‌برداری توسط شناورهای تحقیقاتی مرکز شیلات ایران از صیدگاه‌های استان‌های خوزستان (چوئبده، بوسیف و خور موسی)، بوشهر (دیلم و دیر)، هرمزگان (بندرعباس و جاسک)، سیستان و بلوچستان (میدانی، چابهار، تنگ، پزم و بریس) توسط تور گوشگیر و تور ترال انجام شد (شکل ۱).



شکل ۱: مناطق نمونه‌برداری از ماهی راشگو معمولی در خلیج فارس و دریای عمان

قطعات ۵-۳ گرمی از بافت نرم و تازه باله‌های سینه‌ای و پشتی ماهی راشگو معمولی جدا گردید و پس از تثبیت

در اتانول خالص به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شدند (۱۳). DNA کامل که شامل DNA سیتوپلاسمی (DNA میتوکندریایی) و DNA هسته‌ای است، با استفاده از روش فنل- کلروفرم استخراج شد (۳) و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از الکتروفوزر افقی روی ژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE (1X) حاوی ۰/۵ میکرون بر میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید (Sigma)، با استفاده از سیستم مستندسازی ژل، مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۹). سپس نمونه‌ها برای انجام آزمایشات بعدی، در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از آغازگرهای زیر جهت تکثیر ژن ۲۸S rRNA استفاده گردید.

5́ CAG GAT TCC CAC TGT CCC TAC 3́ (Forward) جلودار

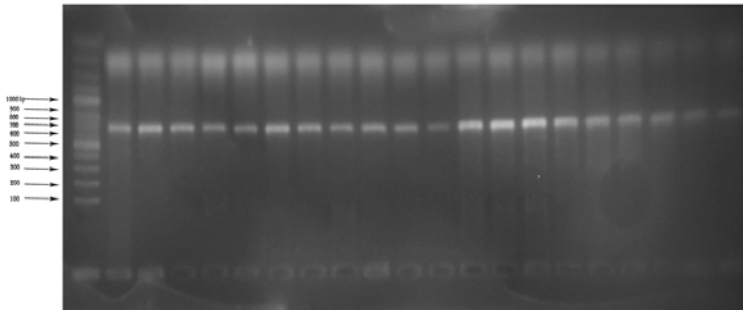
5́ GAT AGG AAG AGC CGA CAT CG 3́ (Reverse) برگشتی

برای تکثیر (PCR) ژن مذکور به وسیله دستگاه ترموسایکلر Quanta Biotech، پس از بهینه‌سازی شرایط واکنش و انتخاب دمای مناسب، جهت واسرشته شدن اولیه (Initial Denaturation) با برنامه یک دور، به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، برای واسرشته‌سازی (Denaturation)، دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۴۵ ثانیه، جهت الحاق آغازگر در کنار DNA (Annealing) دمای ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و به منظور بسط (Extention) دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت ۳ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط نهایی قطعات هدف انجام پذیرفت. محلول واکنش آنزیمی حاوی این مواد بود: ۱ میکرولیتر DNA استخراجی، ۱ پیکومول در میکرولیتر از هر آغازگر، ۵ میلی‌مول در میکرو لیتر dNTP (MBI Fermentas حاوی ۱۰ میلی‌مول از هر یک از نوکلئوتیدهای خالص dATP, dGTP, dCTP و dTTP در بافری با pH =۷/۵)، ۱ واحد آنزیم Taq پلی‌مراز در میکرولیتر (Cinnagen ، ۵ واحد در هرمیکرو لیتر محلول)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X) (Cinnagen، شامل ۵۰ میلی‌مولار KCL_2 و ۲۰۰ میلی‌مولار Tris-HCL)، ۰/۸ میکرولیتر $MgCL_2$ (Cinnagen ، با غلظت ۵۰ میلی‌لیتر مولار) و حجم نهایی مجموعه، با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. محصولات PCR، توسط ژل آگارز الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند و پس از خالص‌سازی توسط شرکت کوثر، تعیین توالی یک طرفه شدند. مقایسه و آنالیز ۴۱ نمونه توالی توسط نرم‌افزارهای Dnasp Ver_5 (۱۶) و Arlequin $Ver_{3.5}$ (۶) انجام شد. توالی‌های حاصله، با توالی ژن ۲۸S rRNA ماهی راشگو معمولی با ثبت ژنی (DQ533028.1) در سایت بانک جهانی ژن، BLAST[1] شدند. به منظور بازتاب روابط فیلوژنی جمعیت‌های ماهی راشگو معمولی در خلیج فارس و دریای عمان، درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار (۹) MEGA Ver_4 به روش نزدیکترین همجواری (NJ) رسم شد. از ماهی شانک باله زرد (*Acanthopagrus latus*) که از نظر رده‌بندی فاصله قابل قبولی با ماهی راشگو داشت، به عنوان out group استفاده شد. همه توالی‌ها توسط CLUSTAL-W، ردیف شدند (۲۰).

نتایج

بررسی باندهای DNA استخراجی با ژل آگارز ۲ درصد و مشاهده شدت باندهای تولید شده، نشانگر قابل قبولی برای استفاده در PCR بود (شکل ۲).

1- BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL



شکل ۲: ارزیابی محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲٪

توالی‌های ژن ۲۸S rRNA در ۴۱ نمونه از ایستگاه‌های ذکر شده، با طول تقریبی ۶۵۸ جفت باز آنالیز شدند. در خوزستان (۴ هاپلوتیپ)، بوشهر (۱ هاپلوتیپ)، بندر عباس (۵ هاپلوتیپ) و چابهار (۲ هاپلوتیپ) محاسبه شد. همچنین بیشترین تنوع هاپلوتیپی درون جمعیت‌ها (h) برای ژن مورد بررسی در بندرعباس (۰/۷۵) و کمترین در بوشهر (صفر) ثبت گردید. ضمن اینکه بیشترین و کمترین مقدار تنوع نوکلئوتیدی ($P(\pi)$) به ترتیب در بندرعباس (۰/۵۰) و بوشهر (صفر) ثبت شد. میانگین تنوع هاپلوتیپ‌ها نیز درون مناطق نمونه‌برداری (۰/۵۲) و میانگین تنوع نوکلئوتیدی (۰/۲۹) بدست آمد (جدول ۱).

جدول ۱: تعداد، تنوع هاپلوتیپ‌ها و نوکلئوتیدها درون جمعیت‌ها

منطقه نمونه‌برداری	n	h	$P(\pi)$
خوزستان	۴	۰/۶۷	۰/۳۴
بوشهر	۱	۰/۰۰	۰/۰۰
بندرعباس	۵	۰/۷۵	۰/۵۰
چابهار	۲	۰/۵۰	۰/۲۰

براساس نتایج بدست آمده از آزمون فاصله ژنتیکی (F_{st}) و جریان ژنی (N_m) بین جمعیت‌ها، به ترتیب بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های بوشهر و بندرعباس (۰/۲۹) و کمترین بین جمعیت‌های بوشهر و چابهار (صفر) مشاهده شد و این آزمون نشان داد که بیشترین جریان ژنی بین جمعیت‌های خوزستان و بندرعباس (۲/۳۳) و کمترین بین جمعیت‌های بوشهر و چابهار (صفر) دیده می‌شود. همچنین آزمون واگرایی (*Divergence*) نشان داد که بیشترین واگرایی بین جمعیت‌های خوزستان و چابهار (۰/۷۱ درصد) و کمترین بین جمعیت‌های بوشهر و چابهار (۰/۰۵ درصد) وجود دارد (جدول ۲).

جدول ۲: فاصله ژنتیکی، جریان ژنی و میزان واگرایی بین مناطق مورد مطالعه در ماهی راشگو معمولی

مناطق مورد مقایسه	F_{st}	N_m	DXY به درصد
خوزستان- بوشهر	۰/۲۸	۰/۶۴	۰/۶۳
خوزستان- بندرعباس	۰/۰۹۷	۲/۳۳	۰/۵۳
خوزستان- چابهار	۰/۲۵	۰/۷۲	۰/۷۱
بوشهر- بندرعباس	۰/۲۹	۰/۶۰	۰/۳۶
بوشهر – چابهار	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۵
بندرعباس – چابهار	۰/۲۵	۰/۷۴	۰/۴۴

آزمون فراوانی هاپلوتیپ‌ها (X^2) بیشترین مقدار را بین جمعیت‌های بوشهر و بندرعباس (۱۲/۳۷) و حداقل را بین جمعیت‌های خوزستان و بندرعباس (۰/۱۵) محاسبه نمود. فراوانی آللی بین بندرعباس و بوشهر، نیز بین بوشهر و خوزستان معنی‌دار بود ($P<$۰/۰۵). در مقایسه تعداد و گوناگونی هاپلوتیپ‌ها (Hd)، بیشترین تعداد هاپلوتیپ‌ها بین جمعیت‌های خوزستان و بندرعباس (۸) و کمترین بین بوشهر و چابهار (۲) بدست آمد. بیشترین و کمترین گوناگونی هاپلوتیپ‌ها نیز در جمعیت‌های مذکور بود که به ترتیب (۰/۸۴) و (۰/۱۱) محاسبه شد (جدول ۳).

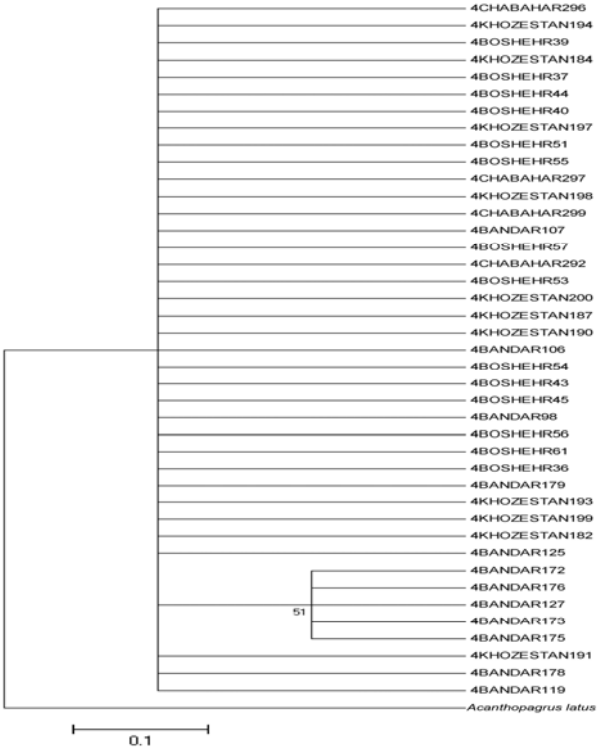
جدول ۳: مقایسه فراوانی هاپلوتیپ‌های راشگو معمولی به تفکیک مناطق نمونه‌برداری برای ژن ۲۸S rRNA

مناطق مورد مقایسه	*H*	*Hd*	X^2	درجه آزادی
خوزستان – بوشهر	۴	۰/۳۵	۱۲/۳۷*	۴
خوزستان – بندرعباس	۸	۰/۸۴	۶/۲۳	۵
خوزستان – چابهار	۵	۰/۶۲	۰/۱۵	۷
بوشهر – بندرعباس	۵	۰/۴۷	۳/۷۰	۱
بوشهر – چابهار	۲	۰/۱۱	۷/۹۵*	۳
بندرعباس – چابهار	۶	۰/۷۴	۴/۷۷	۴

* اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد را نشان می‌دهد.

در منطقه مورد مطالعه ۶ هاپلوتیپ جدید از ماهی راشگو معمولی در بانک ژن SAKURA با شماره‌های AB625626, AB625975, AB625976, AB62597, AB625978, AB625979 ثبت شد.

با رسم درخت فیلوژنی نمونه‌های همه مناطق با یک فاصله و در یک کلاستر قرار گرفتند (شکل ۳).



شکل ۳: درخت فیلوژنی به روش همجواری (NJ)

بحث

نخستین گام در تدوین استراتژی مدیریت ذخایر آبزیان در منابع آبی، مشخص شدن ساختار ژنتیکی جمعیت‌های در حال بهره‌برداری است. این استراتژی در صورتی که بر پایه روش‌های دقیق و قوی مثل داده‌های مولکولی باشد، می‌تواند علاوه بر حفظ تنوع زیستی، میزان برداشت و بهره‌برداری را به حد معقول و حداکثر برساند (۲۰). یکی از راه‌های بررسی ساختار ژنتیکی آبزیان، استفاده از ژنتیک جمعیت، جهت بررسی تحولات ساختاری و درون گونه‌ای است. آنالیز ساختار جمعیتی، تنوع زیستی، ارتباطات گونه‌ای، سیستماتیک و طبقه‌بندی آنها درک روشنی از ساختار جوامع زیستی می‌دهد (۱۵). در این تحقیق میزان تنوع ژنتیکی در مناطق مختلف برای ژن ۲۸S rRNA ماهی راشگو معمولی در خوزستان، بوشهر، بندرعباس و سیستان و بلوچستان در خلیج فارس و دریای عمان بررسی شد.

تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها، پارامتری مهم و اساسی در تکامل و حفاظت بیولوژیکی آنهاست. سطوح بالای تنوع ژنتیکی توانایی جمعیت‌ها را در پاسخ به انتخاب طبیعی و سلامت افراد آن جمعیت افزایش می‌دهد (۸). تراز تنوع هاپلوتیپی می‌تواند از صفر (تمام افراد جمعیت دارای هاپلوتیپ یکسان) تا یک (همه افراد جمعیت دارای هاپلوتیپ‌های متفاوت) متغیر باشد. تعداد و تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی در بندرعباس از آن جمعیتی با پویایی ژنتیکی بالا به نمایش گذاشت، در مقابل بوشهر فاقد هاپلوتیپ و گوناگونی نوکلئوتیدی بود (جدول ۱). شاخص‌های مذکور برای راشگو معمولی، با توالی‌یابی ژن COI در Roebuk Bay بر ۳۸ عدد ماهی، صفر بدست آمد و تنها یک هاپلوتیپ ثبت شد. در Walker River با آزمایش بر ۲۷ عدد ماهی ۹ هاپلوتیپ مشاهده شد. تنوع هاپلوتیپی ۰/۵۱ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۱۲ ثبت گردید. در Archer River ۳۹ ماهی مطالعه شده است و ۱۱ هاپلوتیپ با تنوع ۰/۷۴ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۱۸

حاصل این بررسی بود و بالاخره در Cleveland Bay از ۳۰ ماهی مورد مطالعه، ۷ هاپلوتیپ با تنوع ۰/۷۷ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۲۱ ثبت گردید. نتایج حاصل از این مطالعه از مقدار پایین‌تر و یکنواخت‌تری برخوردار است. تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی ژن COI در گونه دیگر راشگو به نام *Polydactylus macrochir* نیز بررسی شده است. در Roebuk Bay ، ۳۹ ماهی مطالعه شد و ۷ هاپلوتیپ با تنوع ۰/۵۷ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۲۲ ثبت گردید. در Chambers Bay از ۴۱ ماهی مورد مطالعه، ۱۹ هاپلوتیپ با تنوع ۰/۹۲ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۸۳ بدست آمده است. در Flinders River، از ۴۹ ماهی تحت بررسی ۲۱ هاپلوتیپ به دست آمد که تنوع آنها ۰/۹۱ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۹۷ به دست آمد و بالاخره ۷ هاپلوتیپ با تنوع ۰/۴۹ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۲۰ از مطالعه بر ۵۰ نمونه در منطقه Fitzory River به دست آمده است (۲۴). فاصله ژنتیکی (F_{st}) برای جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس آزمون AMOVA محاسبه شد. مقدار F_{st} همیشه مثبت است و بین صفر (هیچ زیر جمعیتی وجود ندارد) و یک (وجود زیر جمعیت و جدایی کامل جمعیت‌ها) متغیر است. زمانی که F_{st} بیشتر از ۰/۲۵ باشد نشان دهنده تمایز بالا و جدایی کامل جمعیت‌ها از یکدیگر می‌باشد. اگر چه دادن یک معنی زیستی به این داده‌ها دشوار است، اما پیشنهاد شده، که اگر شاخص مذکور کمتر از ۰/۰۵ باشد به آن معنی است که، جریان ژنی در میان جمعیت‌ها محدود شده است و اجازه می‌دهد تا بعضی از جمعیت‌ها به زیر جمعیت‌هایی تقسیم شوند (۷) و اگر بین صفر تا ۰/۰۵ باشد، تمایز ژنتیکی پایین، بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز بالاست و مقدار بالای ۰/۲۵ تمایز خیلی بالا است. لذا همانگونه که در جدول ۲ مشاهده می‌گردد انتظار می‌رفت که جمعیت بوشهر با مناطق همجوار خود، کمترین فاصله ژنتیکی و بیشترین جریان ژنی را داشته باشد ولی بیشترین فاصله‌های ژنتیکی و کمترین جریان ژنی بین جمعیت‌های (بوشهر، بندرعباس) و (بوشهر، خوزستان) دیده شد. لذا می‌توان عنوان نمود جمعیت بوشهر که در آن تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی نیز دیده نشد و از طرف دیگر با مناطق همجوار خود یعنی بندرعباس و خوزستان، فاصله ژنتیکی بالا نشان داده است، متعلق به ذخیره ژنتیکی واحد (افراد مربوط به یک جمعیت) و جدا از جمعیت‌های دیگر باشد. به عبارتی بوشهر از جمعیت‌های قدیمی محسوب شده، لذا به ثبات ژنتیکی رسیده است و به اندازه سایر جمعیت‌ها پویا نمی‌باشد (۳). معنی‌دار بودن فراوانی هاپلوتیپ‌ها میان جفت جمعیت‌های بندرعباس و بوشهر، بوشهر و خوزستان هم می‌تواند مؤید فرضیه جدایی این جمعیت، از جمعیت‌های همجوار باشد (۱).

فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های بوشهر و چابهار (صفر) به دست آمد. نتیجه حاصل با میزان جریان ژنی همخوانی ندارد و نیاز به نمونه‌برداری بیشتر، خصوصاً در منطقه چابهار را می‌رساند. فاصله ژنتیکی بین بندرعباس و چابهار هم بالا ثبت شد (۰/۲۵) این فاصله نشانه تمایز بالا است خصوصاً اینکه جریان ژنی بین جمعیت‌های مذکور بالا نیست. از آنجایی که تعداد و تنوع هاپلوتیپ‌ها و همچنین تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت بندرعباس بالا است و بر اساس نتایج حاصله از جدول ۳ نیز بین جمعیت بندرعباس و چابهار تعداد و گوناگونی هاپلوتیپی نسبتاً قابل توجهی دیده می‌شود، لذا شواهد فوق می‌توانند حاکی از بالا بودن نرخ خویش‌آمیزی (Inbreeding) و همچنین جریان ژنی نسبتاً بالا در این منطقه باشند. اختلاف ژنتیکی بین جمعیت خوزستان و بندرعباس (۰/۰۹) ثبت گردید که نشان دهنده تمایز متوسط این دو جمعیت است. البته بیشترین جریان ژنی (۲/۳۳) بین این دو جمعیت مشاهده گردید. حداکثر گوناگونی هاپلوتیپی محاسبه شده (۰/۸۴) و نیز بیشترین تعداد هاپلوتیپ‌ها (۸) بین این دو جمعیت ثبت شد. نتایج حاصله نشان دهنده وجود مهاجرت و تبادل ژنی میان جمعیت‌های مذکور و همانگونه که ذکر گردید، پویایی ژنتیکی بالا در جمعیت بندرعباس است. جمعیت‌های خوزستان و چابهار تمایز بالا و جریان ژنی پایین داشتند. شاید دلیل این پدیده را

بتوان وجود موانعی مانند تنگه هرمز و جریانات دریایی دانست. اگرچه Hoolihan (۲۰۰۶) (۷) عنوان نموده است که شواهد ژنتیکی نشان می‌دهند که تنگه هرمز مانع مؤثری در جابجایی ماهیان پر تحرک در درون و خارج خلیج فارس نیست، ولی به استناد مطالعات (۲۵) Zischke (۲۰۰۹) که راشگو را جزء ماهیان کم تحرک معرفی می‌نماید، می‌توان تمایز بالای جمعیت‌های (خوزستان، چابهار) و (بندرعباس، چابهار) را بنا به علت فوق توجیه نمود. مقدار F_{st} بین (۰/۸۵۸) Roebuk Bay - Walker River، (۰/۷۸۲) Roebuk Bay - Archer River، (۰/۷۲۴) Cleveland Bay–Roebuk Bay و (۰/۱۰۴) Walker River - Archer River، (۰/۱۱۶) Walker River - Cleveland Bay و بالاخره بین (۰/۱۳۴) Archer River - Cleveland Bay برای راشگو معمولی به دست آمده است (۲۴). شاخص مذکور برای ژن COI راشگو *Polydactylus macrochir* (۰/۳۱۹) Roebuk Bay - Chambers Bay–Bay (۰/۳۶۸)، Roebuk Bay - Flinders River (۰/۵۷۵)، Roebuk Bay - Fitzory River (۰/۱۹۸)، Chambers Bay - Flinders River (۰/۰۶۹)، Chambers Bay - Fitzory River (۰/۲۶۱) و در Flinders River - Fitzory River محاسبه شده است که از دامنه محدودتری نسبت به مقادیر حاصل از این بررسی برخوردار می‌باشند (۲۴). البته چون نمونه‌ها از محدوده‌های متفاوت جغرافیایی و به روش‌های آزمایشگاهی مختلف انجام شده‌اند، نمی‌توان داده‌ها را به طور دقیق با همدیگر مقایسه نمود. اما در این مطالعه نیز فاصله ژنتیکی و جریان ژنی تابعی از فاصله جغرافیایی بود به استثنای یک منطقه که علت آن را پدیده تنگنا (Bottleneck) دانسته‌اند. جهت تخمین میزان تباین و انشعاب جمعیت‌ها از هم، آزمون واگرایی (Divergence)، انجام شد. بیشترین انشعاب، بین جمعیت‌های خوزستان و چابهار (۰/۷۱) ثبت گردید که می‌تواند به علت فاصله ژنتیکی و تمایز بالا آن دو جمعیت باشد. بین جمعیت راشگو معمولی در بوشهر – که آن را جمعیتی به ثبات رسیده فرض کردیم – و جمعیت این ماهی در چابهار نیز فاصله ژنتیکی و جریان ژنی صفر بود. همین طور کمترین واگرایی بین دو جمعیت مذکور (۰/۰۵) ثبت شد. چنانچه در جدول ۳ ملاحظه می‌گردد، کمترین تعداد هاپلوتیپ (۲) و گوناگونی هاپلوتیپی (۰/۱۱) بین جمعیت‌های بوشهر و چابهار دیده می‌شود. از آنجایی که تعداد نمونه‌های هدف در چابهار کم یافت می‌شود، نتایج حاصله در این منطقه به خوبی قابل تفسیر نیستند (۲۲). Robert (۲۰۰۵)، میانگین واگرایی درون گونه‌ای را بین جمعیت‌های ماهیان ۱۴/۰۸–۰ در آب‌های استرالیا به دست آورده است.

درختان فیلوژنیک مسیرهای تکاملی را نشان می‌دهند و می‌توان از آنها برای درک روابط تکاملی بهره جست. به عبارت دیگر هرچه موجودات مورد بررسی شباهت بیشتری در مولکول‌های توارثی داشته باشند، خویشاوندی نزدیکتری دارند. در اغلب موجودات زنده، از داده‌های مربوط به توالی DNA برای تعیین روابط تکاملی استفاده می‌شود (۱۰). لذا با رسم درخت فیلوژنی به روش (NJ)، برای گونه راشگو معمولی در مناطق مختلف خلیج فارس و دریای عمان، همگی در یک کلاستر قرار گرفتند و شانک بالله زرد (*Acanthopagrus latus*) به عنوان برون‌گونه (out group) در کلاستری دیگر جای گرفت. نتایج به دست آمده از این مطالعه ممکن است به سبب تعداد نمونه‌ها و عدم جداسازی جنس‌ها به هنگام آنالیز داده‌ها، محدود باشد. بنابراین داده‌های ژنتیکی و آنالیزهای بیشتری برای تایید نتایج حاصله مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

از مؤسسه تحقیقات شیلات ایران به جهت تأمین اعتبار مالی این طرح، مسئولین محترم پژوهشکده اکولوژی دریای خزر (محل انجام پروژه مذکور)، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱- حاجی‌رستملو محبوبه، رضوانی‌گیل‌کلایی سهراب، فاطمی سیدمحمدرضا، صادقی‌زاده مجید، لالویی فرامرز (۱۳۸۶). بررسی مولکولی جمعیت آرتمیا پارتنوژنتیکا *(Artemia parthenogenetica)* در ایران به روش PCR-RFLP مجله علمی شیلات ایران، سال شانزدهم، شماره ۴، صفحات ۶۷-۵۳.

2- Aboim M.A., Menezes G.M., Schlitt T. and Rogers A.D. (2005). Genetic structure and history of populations of the deep-sea fish Helicolenus dactylopterusinferred from mtDNA sequence analysis. Molecular Ecology.14: 1343-1354.

3- Baldwin J.D., Bass A.L., Bowen B.W. and Clark (1998). Molecular phylogeny and Biogeography of the Marine shrimp *Penaeus monodon*. Molecular Phylogenetic evolution. 10: 399- 407.

4- Bradbury I.R., Campana S.E. and Bentzen P. (2008). Low genetic connectivity in an estuarine fish with pelagic larvae. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science. 65: 147-158.

5- Campbell R.A. and Beveridge I. (1996). Revision of the family Pterobothriidae Pintner, 1931 (Cestoda:Trypanorhyncha). Invertebrate Taxonomy. 10: 617-662.

6- Excoffier L., Laval G. and Schneider S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformatics*. 1: 47-50.

7- Hoolihan J.P., Anandh P.J. and Herwerden L.V. (2006). Mitochondrial analyses of narrow-barred Spanish mackerel (Scomberomorus commerson) suggests a single genetic stock in the ROPME sea area. ICES Journal of Marine science. 63: 1066-1074.

8- Kalinowski S.T. (2005). Do polymorphic loci require large sample sizes to estimate genetic distances. Journal of Heredity. 94: 33-36.

9- Kumar S., Tamura K., and Nei M. (1993). MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Version 1.01. Pennsylvania State University.

10- Lundrigan T.A., Reist J.D. and Ferguson M.M. (2005). Microsatellite genetic variation within and among Arctic char (*Salvelinus alpines*) from aquaculture and natural populations in North America. Aquaculture. 244: 63-75.

11- Martin cesar Wasko A.P., Oliveria C. and Foresti F. (2003). Mitochondrail DNA variation in wild populations of *Leporinus elongates* from the parana river basin. Genetic and molecular Biology. 26 (1): 33-38.

12- Moore B., Newman S.J., Pember M., Allsop A., Saunders T., Ballagh A. and et al. (2009). Threadfin fisheries across the north. Western Fisheries, WA Journal of Fishing and the Aquatic Environment, September 2009. pp. 50-51.

13- Motomura H., Iwatsuki Y., Kimura S. and Yoshino T. (2002). Revision of the Indo -West Pacific polynemid fishg enus *Eleutheronema* (Teleostei perciformes) Ichtyological Research. 49: 47-61.

14- Pember M.B., Newman S.J., Hesp S.A., Yong G.C., Skepper C.L., Hall N.G. and et al. (2005). Biological parameters for managing the fisheris for Blue and Threadfin salmons, Estuary Rockcod, Malabar Grouper and Mangrove Jack in north - Western Australia. Fisheries Research and Development Corporation Final Report NO.02/003. Center for Fish and Fisheries Research, Murdoch University, Murdoch,WA.

15- Rezvani GilKolaei S., Imanifar A., Aghili R. and Laloei F., (2007). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of *Rutilus rutilus* population on the southern coast of the Caspian Sea, Iran. Journal of Marine Biology Associatation. U.k. 86: 1463-1467.

16- Rozas J., Sanchez-DelBarrio J.C., Messeguer X. and Rozas R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics, 19: 2496-2497.

17- Santi-Rampazzo A.P., Nishiyama P.B., Ferreira P.E.B. and Martins-Santos I. (2008). Intrapopulational polymorphism of nucleous organizer regions in Serrapinnus notomelas (*Characidae, Cheirodontinae*) from the Parana River. Journal of Fish Biology.72: 1236-1243.

18- Solomon C.T., Weber P.K., Cech J.J., Ingram B.L., Conrad M.E., Machavaram M.V., and et al. (2006). Experimental determination of the sources of otolith carbon and associated isotopic fractionation. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 63: 79-89.

19- Thai B.T., Pham T.A. and Austin G.M. (2006). Genetic diversity of common carp in Vietnam using direct sequencing and SSCP analysis of the mitochondrial DNA control region. Aquaculture. 258: 228-240.

20- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins D.G. (1997). The CLUSTAL-X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acid Research. 25: 4876-4882.

21- Tsoi K.H., Wang Z.Y. and Chu K.H. (2005). Genetic divergence between two morphological similar varietics of the kurma shrimp *penaeus Japonicus* Marine Biology. 147: 367-379.

22- 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 Bulletin. doi:10. 1098/ rstb. 1716. Published Online.

23- Welch D.J., Gribble N.A. and Garrett R.N. (2002). Assessment of the threadfin salmon fishery in Queensland 2002. Report NO.QI02115,Queensland Department of Primary Industries and Fisheries, Cairns.QLD. PP: 120-125.

24- Welch D.J., Ballagh A., Newman S.J., Lester R.J., Moore B., Herwerden L. and et al. (2010). Defining the stock structure of northern Australia' s threadfin salmon species.FRDC project NO. 2007/032.P.13- 159.

25- Zischke M.T. and Cribb T.H. (2009). Stock structure of blue threadfin on the *Eleutheronema tetradactylum* Queensland east coast, as determined byparasites anconventional tagging. Journal of fish Biology. 75: 156-171.