# بررسی جمعیت ماهی راشگوی معمولی(*Eleutheronema tetradactylum* ) در سواحل خلیج فارس با کمک نشانگر ریزماهواره

امیر جافریان[۱و۲] ، حسین ذوالقر نین[۲] ، مهدی محمدی [۳]، محمدعلی سالاری علی آبادی[۲] ، سیدجواد حسینی[۳]

۱. عضو هیات علمی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
۲. گروه زیست شناسی دریا- دانشکده علوم و فنون دریایی- دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۳. گروه بیوتکنولوژی دریا- مرکز مطالعات و پژوهش های خلیج فارس- دانشگاه خلیج فارس بوشهر

## چکیده

راشگوی معمولی در آبهای ساحلی کم عمق با بستر شنی یا گلی زندگی می کند. از این خانواده ۷ جنس و ۳۵ گونه در آبهای گرم شناسایی شده است. از نظر اقتصادی جز ماهیان ممتاز خلیج فارس محسوب می شوند. نمونه برداری در این تحقیق با استفاده از قایق های صیادی مجهز به تورگوشگیر و بعضاً قلاب در حوزه خلیج فارس انجام شد. تعداد شش جایگاه آلل استفاده شد. بیشترین تعداد آلل مشاهده شده در جایگاه Eletet2 و مربوط به نمونه های استان بوشهر (۵ آلل) و کمترین مقدار آن در جایگاه Eletet16.0 و مربوط به نمونه های استان خوزستان می باشد (۱ آلل). کمترین دامنه Ho در جایگاه Eletet16.0 درنمونه های جمع آوری شده از استان خوزستان و بیشترین مقدار در جایگاه Eletet16.0 مربوط به استان بوشهر می باشد. بیشترین مقدار شاخص شانون در جایگاه Eletet2 در استان بوشهر( ۱/۴۹۴ ) و کمترین مقدار آن جایگاهEletet17 در استان خوزستان(۰/۶۳۷) می باشد. بر اساس تست AMOVA درسطح احتمال ۰/۰۱ اختلاف بین نمونه های هرمنطقه (P≤ ۰/۰۵ و ۷۶٪) ، اختلاف بین گروه ها(نواحی) (P≤ ۰/۰۵ و ۰٪) ، اختلاف بین مناطق(P≤ ۰/۰۵ و ۲۴٪) محاسبه شد. شباهت ژنتیکی بر اساس معیار(Nei,(1972 میان نمونه های استان خوزستان و بوشهر(۰/۴۸۶) و فاصله ژنتیکی میان نمونه های استان خوزستان و بوشهر(۰/۶۱۵)وجود دارد.

در مطالعه حاضر بیشترین مقدار هتروزایگوسیتی مورد در جایگاه Eletet2 در نمونه های استان بوشهر می باشد. بیشترین مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده(Ho)، ۰/۹۲۳ مربوط به جایگاه Eletet16.0 و نمونه های استان بوشهر می باشد. در این بررسی مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده از مقدار هتروزایگوستی مورد انتظار بیشتر می باشد که بیانگر تغییرپذیری ژنتیکی در این ماهی بعلت مهاجرت ها نزدیک و دور و دسترسی به آبهای آزاد(جریان ژنی بالا) می باشد. نتایج حاکی از آن است که احتمالاً یک جمعیت ماهی راشگوی معمولی در مناطق نمونه بردای وجود دارد و لازم است نگاه شیلات در مدیریت این گونه، یکسان باشد.

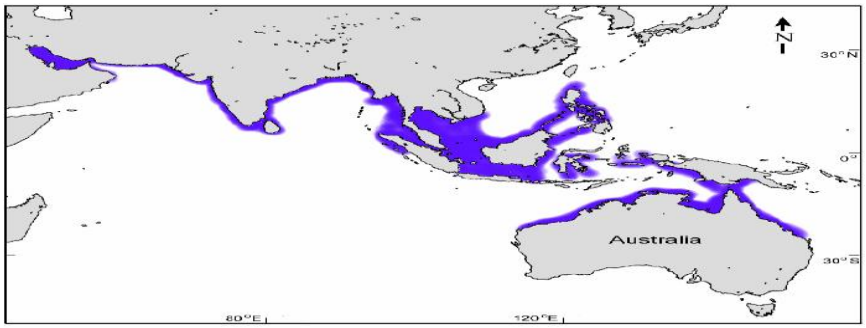
**واژگان کلیدی**: ماهی راشگوی معمولی، *Eleutheronema tetradactylum* ، خلیج فارس، ریزماهواره

۱. مقدمه

تا پایان قرن بیست و یکم میلادی نیمی از گونه‌های زیستی موجود در جهان یعنی در واقع نیمی از تنوع زیستی جهان را از دست خواهیم داد، می‌بینیم که این تعداد گونه‌های موجود در جهان خیلی زیاد نیست و با ادامه روند کنونی نابودی تنوع زیستی، به زودی این سرمایه تجدیدناپذیر را از دست می‌دهیم( FAO, 1999; Bagley *et al*., 2002 ). بنابراین با تعمیق فکر و اندیشه، امروزه جایگزین کردن نگرش "غلبه بر طبیعت" با "زندگی در طبیعت" و حفاظت از تنوع زیستی یکی از اساسی‌ترین مسائل غالب کشورهای جهان محسوب می‌گردد و این امر نیز بدون بررسی و شناخت تنوع زیستی یک منطقه یا کشور و به بیان دیگر شناسایی موجودات مختلف میسر نیست( FAO, 1999 ).

خوشبختانه تنوع این ذخائر که یک موهبت و عنایت الهی است در کشورعزیزمان، کاملاً هویدا است و با بررسیهای علمی و هوشمندانه می‌توان به راه کار عملی برای حفاظت این ذخایر دست یافت. وضعیت بحرانی زیستگاه‌ها و گونه‌ها یک حقیقت است و شانه خالی کردن از زیر بار مسئولیت، تنها منجر به تسریع این فرآیند زیانبار می‌گردد. بر کسی پوشیده نیست که اگر تمهیداتی در این زمینه در نظر گرفته نشوند روز بروز مشکلی همچون خالی شدن ذخایر ژنتیکی جدی تر می‌شود. لذا ضرورت دارد همه دست اندرکاران امر و همه آنهایی که احساس وظیفه ملی در مقابل ملت و کشور خود و مردم جهان میکنند، آستین بالا زده و در فکر و طرح نو برآیند و چاره‌ای بیاندیشند. در این راستا سند بیست ساله کشور، حفاظت محیط زیست و احیای منابع طبیعی را بعنوان یکی از اصول بند ۱۹ و تحت عنوان آمایش سرزمین مورد تاکید قرار داده است(رجایی و همکاران،۱۳۸۳).

با توجه به اهمیت تنوع ژنتیکی ونقش آن در بررسی تاریخچهء جمعیت‌ها و گونه‌ها، و ضرورت شناخت و حفاظت تنوع در حداقل کردن احتمال از بین رفتن گونه‌های مطلوب و پایدار کردن گونه‌ها (تنوع ژنتیکی برای سازش تکاملی گونه‌ها با تغییرات محیطی لازم است)، همچنین با توجه به اهمیت بالای ماهیان ممتاز بویژه راشگوی معمولی در اقتصاد شیلاتی کشور بویژه استان های جنوبی، سعی شد با بررسی بنیان ژنتیکی این ماهی، راه را برای مدیریت حفاظت این گونه هموار نمود و راهکارهایی برای حداقل نمودن زوال تنوع ژنتیکی پیدا کرد. در خصوص اهمیت شیلاتی راشگوی معمولی بایستی به نکات زیر اشاره نمود که این ماهی از دیر باز مورد توجه ویژه ساحل نشینان و در زمره ماهیان ممتاز منطقه خلیج فارس و دریای عمان قرار دارد. این گونه بعد از حلوا سفید *Pampus Arghentius* بالاترین قیمت در میان آبزیان حوزه خلیج فارس را به خود اختصاص داده است. هرچند ذخایر این آبزی نسبت به ذخایر سایر ماهیان بسیار کمتر می باشد، اما از لحاظ ارزش اقتصادی مهم تر است. اهمیت این ماهی در اقتصاد شیلاتی کشور به حدی است که با اینکه درصد کمی از فرآورده های شیلاتی را تشکیل می دهد؛ اما میزان درآمد آن قابل توجه می باشد (رجایی و همکاران،۱۳۸۳). راشگوی معمولی در آبهای ساحلی کم عمق با بستر شنی یا گلی زندگی می کند و وارد رودخانه ها نیز می شود. حرکات کندی داشته و غالباً به آرامی باقی می ماند. این ماهیان در نواحی ساحلی مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری زیست می کنند. گونه راشگوی معمولی به ۲ متر هم می رسد که از نظر بازاری حائز اهمیت است. گوشت آنها طعم عالی دارد و از نظر اقتصادی جز ماهیان ممتاز خلیج فارس محسوب می شوند. از این خانواده ۷ جنس و ۳۵ گونه در آبهای گرم شناسایی شده است. تعدادی از جنس های این خانواده که نسبتا بزرگ هستند در سواحل کم عمق و بعضا گل آلود و بصورت گله های بزرگ زندگی می کنند(Pember, 2006). شکل ۱پراکنش این گونه را در جهان نشان می دهد.




شکل۱- پراکنش ماهی راشگوی معمولی در جهان(اقتباس از: Pember, 2006)

## ۲. مواد و روش کار

نمونه برداری: نمونه برداری با استفاده از قایق های صیادی مجهز به تو گوشگیر* و بعضاً قلاب در مناطق شمال غربی(محدوده بندر آبادان، بندر ماهشهر و بندر هندیجان) و شمالی ( محدوده بندر بوشهر تا بندر دیر)حوزه خلیج فارس انجام شد. کلیه ۷۹ قطعه ماهی صید شده از صیدگاه ها، مطابق جدول۱ به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی مرکز مطالعات و پژوهشهای خلیج فارس وابسته به دانشگاه خلیج فارس(بوشهر) منتقل شدند. - استخراج DNA از باله ماهی با استفاده از CTAB : پس از صید ماهی و انتقال آنها به فریزرژ(۲۰- درجه سانتی گراد) ، قسمتی از باله دمی ماهی توسط قیچی بریده شده و به داخل لوله میکروتیوپ( اپندورف) ml ۱/۵ حاوی الکل مطلق ریخته شد. سپس به شرح ذیل DNA ژنومی ماهی استخراج گردید .Jaferian&*et al* (2011). حدود ۱۰۰ میلی گرم از نوک باله دمی به ابعاد تقریبی ۰/۵cm ×۰/۵cm را با قیچی استریل برش داده و در یک میکروتیوپ ml ۱/۵ استریل قرار داده شد. به هر لوله ۶۳۰ میکرو لیتر بافر CTAB گرم(دمای( ۶۵ درجه سانتی گراد) و ۷۰ میکرولیتر SDS(10%) اضافه نموده، بطوریکه روی باله را بافر بپوشاند.سپس با قیچی استریل شده بافت مورد نظر به اندازه کافی قطعه قطعه و ریز شد. به میزان ۷ میکرو لیتر آنزیم پرو تئیناز k (20 mg/ml) به هر لوله افزوده, درب لوله را محکم بسته و با ورتکس[1] به خوبی مخلوط گردید. لوله‌ها به مدت ۶ ساعت در ترمومیکسرشیکردار(۶۵۰rpm) و در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از انکوباسیون به میکروتیوپ، ۲۴۳ میکرولیتر NaCl(5M) و ۵ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول اضافه نموده و در ترمومیکسر شیکردار(۶۰۰rpm) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوپ اضافه نموده و پس از ورتکس به مدت ۵ دقیقه در شیکر قرار داده شد. فاز رویی[2] را که فاز آبی است به یک لوله جدید منتقل کرده و هم حجم آن ایزوپروپانل سرد(۲۰- درجه سانتی گراد) افزوده، به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۲۴ درجه سانتریفوژ( rpm ۱۲۰۰۰) شد. به رسوب ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه شد. پس از سانتریفوژ(۸۰۰۰rpm و به مدت ۵ دقیقه)، الکل را دور ریخته ولوله را وارونه به مدت نیم ساعت قرار داده، تا باقیمانده الکل تبخیر گردد. رسوب DNA را در۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی(DWW) حل کرده و محلول DNA را در دمای ۴°C (به مدت یک شبانه روز به منظور بهتر حل شدن DNA) تا انجام مراحل بعدی پژوهش ذخیره شد.

* Gill net

1. Vortex
2. Supernatant

جدول ۲-۲- تعداد و پراکنش نمونه های جمع آوری شده ماهی راشگوی معمولی

| صیدگاه(استان) | محل صید | تعداد نمونه |
|---|---|---|
| خوزستان | چوئبده آبادان | ۱۵ |
| | بندر ماهشهر | ۱۵ |
| | بندر هندیجان | ۱۶ |
| بوشهر | بندر جلالی | ۱۸ |
| | بندر دیر | ۱۵ |

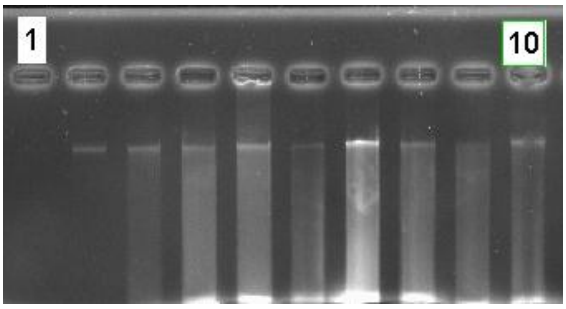
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) : واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بکار رفته یک PCR پایه بوده که در آن پس از بررسی شیب دمایی، از پارامترهای زیر استفاده شد. برنامه PCR شامل۳۲ سیکل تکثیر با دمای واسرشت شدن اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، سپس دمای واسرشت ۹۴ درجه برای ۳۰ ثانیه، دمای اتصال متغییر برای مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه بود که بوسیله دستگاه ترموسایکلر بهینه شد. ضمناً حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرو لیتر بوده که مواد آن باغلظت نهایی در جدول ۲ مشخص می‌باشد.

جدول ۲- ترکیب و میزان مواد در واکنش PCR

| اجزای واکنش | حجم واکنش(۲۵ µl) |
|---|---|
| DNA Templet | ۱ |
| dNTP | ۱ |
| PCR Buffer | ۲/۵ |
| $MgCl_2$ | ۱/۲۵ |
| Taq polymerase | ۰/۳ |
| Forward primer | ۲ |
| Revers primer | ۲ |
| تزریقی DDW | ۱۴/۲۵ |

## ۳. نتایج

بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (۷ /۰ درصد) نشان داد کهباندهای DNA بسیار قوی و شفاف بودند واین بیانگر آنست که DNA استخراجی فاقد آلودگی پروتئینی است (شکل۲).




شکل۲- نمونه‌ای ازDNA استخراج شده به روش CTAB برروی ژل آگاروز۰/۷ درصد

میزان جذب در طول موج ۲۶۰ nm ونسبت طول موج ۲۶۰nm به ۲۸۰ بوسیله اسپکتروفتومتر قرائت گردید. غلظت DNA استخراجی در کلیه ۳۰ نمونه بین $ng/l$ ۲۴۰-۱۵۵ بود که پس از رقیق سازی و همسان سازی غلظت DNA ، در غلظت$ng/l$ ۱۰۰

مـورد اسـتفاده قـرار گرفـت. تعـداد شـش جایگـاه بـا مشخصات مندرج در جدول ۳ مورد اسـتفاده و تکثیـر شد.

جدول ۳- توالی و مشخصات جفت آغازگرهای مورد استفاده در هر جایگاه

| نام آغازگر | 3'-5' توالی | OD 260 | غلظت (µg/ml) | وزن مولکولی | دمای ذوب C° | درصد بازهای GC |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Eletet 1-1 | F: CTGTTTCTGTTTCTGTTCTCCC<br>R: CTTTGCTTGACTCGTCTGTTTT | ۷ | ۲۳۰/۹ | ۶۶۰۰ | ۶۰ | ۴۵/۵ |
| | | ۷/۷ | ۲۴۳/۶ | ۶۶۶۴ | ۵۸ | ۴۰/۹ |
| Eletet 1-2 | F: CTTCCGGAGAGGAACAAACAG<br>R:CTCAGTTTAGAGGAACTTTTATAT | ۷/۲ | ۱۸۷/۷ | ۶۴۷۳ | ۶۱ | ۵۲/۴ |
| | | ۸ | ۲۱۸/۱ | ۷۳۵۷ | ۵۷ | ۲۹/۲ |
| Eletet 2 | F: CACACACAGGTCCGTCACTC<br>R: GGCAGGTCGAGTCTCATACA | ۸ | ۲۳۲/۲ | ۶۰۰۷ | ۶۳ | ۶۰ |
| | | ۷/۹ | ۲۱۷/۹ | ۶۱۴۲ | ۶۰ | ۵۵ |
| Eletet 10 | F: GGCGATGTCGGCAACCCACC<br>R: GCGCCGGCCCTCACTTTCAT | ۶/۲ | ۱۸۰/۵ | ۶۰۸۸ | ۶۷ | ۷۰ |
| | | ۶/۸ | ۲۱۲/۹ | ۶۰۰۵ | ۶۵ | ۶۵ |
| Eletet 16 | F: CACCCNACCCGTCTTGAAAC<br>R: CCAGNGAATTCGAGCTCGGT | ۵/۳ | ۱۵۴/۷ | ۵۹۸۷ | ۶۱ | ۵۷/۵ |
| | | ۵/۲ | ۱۴۶/۵ | ۶۱۳۸ | ۶۱ | ۵۷/۵ |
| Eletet 17 | F: GAAATCTCTCTCTCCTCACAT<br>R: GGCTAATCATTTCTCCACTCT | ۶/۵ | ۱۹۰/۸ | ۶۲۷۶ | ۵۷ | ۴۲/۹ |
| | | ۷/۹ | ۲۳۵/۱ | ۶۳۰۷ | ۵۷ | ۴۲/۹ |

نتایج حاصل از PCR : پس ازقرار دادن نمونـه هـا در دستگاه PCR مدت ۱۱۰ دقیقه برای تکمیل برنامه صرف گردیدوسـپس محصـول PCR بـرروی ژل پلـی اکریل آمید۶٪ الکتروفورز و با نیترات نقره رنگ آمیزی شد.

آللهای پلی مورف(چند شکلی) : مطابق با تعریف پلی مورف بودن از پـنج جفـت پرایمـر طراحـی شـده برای ماهی راشگوی معمـولی، سـه جفـت چندشـکلی هستند چرا که فراوانی آلل درآنها کمتـر از ۹۹ درصـد اسـت. فراوانـی آللـی جایگـاه هـای مـورد مطالعـه درجدول۴ آمـده اسـت.در اسـتان خوزسـتان حـداکثر فراوانـی آللـی ۰/۶۶۷ مربـوط بـه آلـل ۳ در جایگـاه Eletet17 وحداقل فراوانی ۰/۱۵۴ مربـوط بـه آلـل ۵ در جایگاه Eletet2 می باشد.در استان بوشهر حـداکثر فراوانی آللـی۰/۵ مربـوط بـه آلـل هـای ۳ در جایگـاه Eletet16.0 و حداقل فراوانی ۰/۰۳۸ مربوط به آلـل های ۱و۲ در جایگاه Eletet16.0 است.

**تعداد آلل واقعی (Na )و موثر ( Ne )** : معیـار دیگـری کـه بـرای تعیـین میـزان چنـد شـکلی(پلی مورفیسم) جایگاه ها اسـتفاده مـی شـود، تعـداد آلـل واقعی و موثر است . بیشترین تعداد آلل مشاهده شده در جایگاه Eletet2 و مربوط بـه نمونـه هـای اسـتان بوشـهر (۵ آلـل) و کمتـرین مقـدار آن در جایگـاه Eletet16.0و مربوط به نمونه های اسـتان خوزسـتان می باشد (۱ آلل). در میان منـاطق نمونـه بـرداری در جایگاه های سه گانه بیشـترین وکمتـرین تعـداد آلـل مـوثر (۴/۱۵۴) و (۱/۰) بـه ترتیـب در جایگـاه Eletet2 استان بوشهر و در جایگاهEletet16.0 استان خوزستان است(جدول ۵).

تنوع ژنتیکی : تنـوع ژنتیکـی درون جمعیتـی بـا معیارهای همچون هتروزیگوسیتی مشاهده شـده (Ho) و مـورد انتظـار (He) ، بـرای هـر منطقـه در هـر جایگاه و بازای هـر جایگـاه درتمـامی منـاطق مـورد استفاده قرار گرفت. دامنه Ho در بـین منـاطق نمونـه برداری در جایگاه های سـه گانـه بـین ۰/۹۲۳-۰/۰ و

متوسط (۰/۶۲۰)می باشد که کمترین مقدار در جایگاه Eletet16.0 درنمونه های جمع آوری شده از خوزستان و بیشترین مقدار در جایگاه Eletet16.0 مربوط به استان بوشهر می باشد(جدول۶). دامنه He نیزبین ۰/۷۵۹-۰/۰و متوسط (۰/۵۳۱ ) است که کمترین مقدار در جایگاه هایEletet16.0 مربوط به استان خوزستان و بیشترین مقدار در جایگاه Eletet2 استان بوشهر می باشد(جدول۷).

جدول۴- خصوصیات و نتایج بدست آمده از جایگاه های چندشکلی(پلی مورف)

| ردیف | توالی تکراری | نام جایگاه | محدوده باندی(bp) | دمای اتصال($^{c}$) | تعداد آلل مشاهده شده |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | $(AC)_7$ | Eletet2 | 80-98 | ۵۷ $^{c}$ | ۵ |
| ۲ | $(CG)_5$… $(GC)_4$ | Eletet16.0 | 144-184 | ۵۷$^{c}$ | ۴ |
| ۳ | $(TC)_5$ | Eletet17 | 68-96 | ۵۴$^{c}$ | ۴ |

جدول۵ تعداد آلل واقعی وموثر سه جایگاه بررسی شده در ماهی راشگوی معمولی

| جایگاه آلل | جمعیت استان بوشهر N= ۱۵ | | جمعیت استان خوزستان N= ۱۳ | | میانگین | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Na | Ne | Na | Ne | Na | Ne |
| Eletet2 | ۴ | ۳/۴۱۴ | ۵ | ۴/۱۵۴ | ۴/۵ | ۳/۷۸۴ |
| Eletet16.0 | ۱ | ۱/۰ | ۴ | ۲/۳۱۵ | ۲/۵ | ۱/۶۵۸ |
| Eletet17 | ۲ | ۱/۸ | ۴ | ۳/۴۴۹ | ۳ | ۲/۶۲۴ |

جدول۶- مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) ومورد انتظار(He)برای منطقه های نمونه برداری درهرجایگاه

| جایگاه آلل | جمعیت استان بوشهر | | جمعیت استان خوزستان | |
|---|---|---|---|---|
| | $H_O$ | $H_E$ | $H_O$ | $H_E$ |
| Eletet2 | ۰/۶۶۷ | ۰/۷۵۹ | ۰/۶۹۲ | ۰/۷۰۷ |
| Eletet16.0 | ۰/۹۲۳ | ۰/۵۶۸ | ۰/۰ | ۰/۰ |
| Eletet17 | ۰/۷۶۹ | ۰/۷۱۰ | ۰/۶۶۷ | ۰/۴۴۴ |

جدول۷- مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) ومورد انتظار (He) در سطح جایگاههای ژنی

| نام جایگاه | $H_O$ | $H_E$ |
|---|---|---|
| Eletet2 | ۰/۶۷۹ | ۰/۷۳۳ |
| Eletet16.0 | ۰/۴۶۲ | ۰/۲۸۴ |
| Eletet17 | ۰/۷۱۸ | ۰/۵۷۷ |

چون حد نهایی هتروزیگوسیتی یک است و تفاوت میان مقادیر بین صفر ویک به خصوص برای نشانگرهای بسیار چند شکلی مثل ریزماهواره ها (که دراکثر موارد هتروزیگوسیتی حدود۰/۸یا بالاتر دارند ) به میزانی نمی باشد که اطلاعات دقیقی را بیان کند. بنابراین برای بزرگنمایی این مقادیر شاخص اطلاعات shanon ($H'$) استفاده شد. شاخص اطلاعات shanon ($H'$) برای همه مناطق نمونه برداری به ازای جایگاههای سه گانه محاسبه گردید که نتایج حاصله را در جدول شماره ۸ خلاصه گردیده است. بیشترین مقدار شاخص شانون در جایگاه Eletet2 در استان بوشهر( ۱/۴۹۴ ) و کمترین مقدار آن جایگاه Eletet17 در استان خوزستان(۰/۶۳۷) می باشد.

تعادل هاردی –واینبرگ : به منظور بررسی تعادل هاردی واینبرگ در تمامی مناطق مورد بررسی وجایگاه های مختلف از آزمون $X^2$ استفاده شد . استان های خوزستان و بوشهر در تمامی جایگاه ها در تعادل بودند(جدول۹ ).

- تمایز بین نواحی نمونه برداری، مناطق هر ناحیه و نمونه های هر منطقه : برای تعیین اختلاف بین نواحی (گروه ها) و مناطق هر ناحیه و نمونه های هر منطقه از شاخص های Fit, Fst وFis استفاده می شود، که شاخص های محاسبه شده در جدول۱۰ آورده شده است.

جدول ۸- شاخص اطلاعاتی شانون Shanon index درمناطق نمونه برداری وجایگاههای مختلف آللی

| جایگاه آلل | استان بوشهر | استان خوزستان | میانگین |
|---|---|---|---|
| Eletet2 | ۱/۴۹۴ | ۱/۳۰۷ | ۱/۴۰۱ |
| Eletet16.0 | ۰/۹۶۱ | ۰/۰۰ | ۰/۴۸۱ |
| Eletet17 | ۱/۳۰۶ | ۰/۶۳۷ | ۰/۹۷۱ |

جدول۹- نتایج ازمون $x^2$ برای تعادل هاردی- واینبرگ در سطح جایگاهها برای همه نمونه ها

| معنی داربودن | احتمال | $X^2$ | درجه ازادی df | جایگاه | |
|---|---|---|---|---|---|
| *** | ۰,۰۰ | ۴۸/۳۶۵ | ۱۰ | Eletet2 | کل نمونه ها |
| *** | ۰,۰۰ | ۵۶/۳۶۷ | ۶ | Eletet16.0 | کل نمونه ها |
| *** | ۰,۰۰ | ۴۰/۹۵۸ | ۶ | Eletet17 | کل نمونه ها |

جدول ۱۰- میزان Fit, Fst وFis محاسبه شده در نمونه های جمع آوری شده از مناطق مختلف برحسب جایگاه ژنی

| شاخص | جایگاه Eletet2 | جایگاه Eletet16.0 | جایگاهEletet17 |
|---|---|---|---|
| Fis | ۰/۰۷۳ | -۰/۶۲۵ | -۰/۲۴۴ |
| Fit | ۰/۰۸۸ | -۰/۰۷۲ | -۰/۰۰۹ |
| Fst | ۰/۰۱۶ | ۰/۳۴۰ | ۰/۱۸۹ |

جدول ۱۱- آزمون A MOVA با در نظر گرفتن دو (ناحیه) نمونه برداریFst

| منبع | درجه آزادی | انحراف معیار | میانگین مربعات | واریانس | درصد | احتمال |
|---|---|---|---|---|---|---|
| اختلاف میان مناطق نمونه برداری | ۱ | ۸/۳۳۷ | ۸/۳۳۷ | ۰/۲۷ | ۲۴ | ۰/۰۱ |
| اختلاف میان افراد مختلف | ۲۶ | ۲۱/۴۸۵ | ۰/۸۲۶ | ۰ | ۰ | ۰/۰۱ |
| اختلاف بین افراد مختلف در هرمنطقه نمونه برداری | ۲۸ | ۲۳/۵ | ۰/۸۳۹ | ۰/۸۳۹ | ۷۶ | ۰/۰۱ |

جدول۱۲- ماتریس فواصل ژنتیکی و شباهت ژنتیکی (Nei,1972) (عدد بالای قطر مربوط به شباهت ژنتیکی و زیر قطر مربوط به فاصله ژنتیکی میباشد.)

| منطقه | جمعیت بوشهر | جمعیت خوزستان |
|---|---|---|
| جمعیت بوشهر | ۰ | ۰/۴۸۶ |
| جمعیت خوزستان | ۰/۶۱۵ | ۰ |

تنوع ژنتیکی بر اساس سلسله مراتب جمعیتی دو منطقه(Population) (شامل استان خوزستان و استان بوشهر) و بر اساس تست AMOVA* درسطح احتمال ۰/۰۱ اختلاف بین نمونه های هرمنطقه (P≤ ۰/۰۵ و ۷۶٪) ، اختلاف بین گروه ها(نواحی) (P≤ ۰/۰۵ و ۰٪) ، اختلاف بین مناطق (P≤ ۰/۰۵ و ۲۴٪) محاسبه شد(جدول۱۱). **شباهت و فواصل ژنتیکی:** ماتریس فواصل وشباهت ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی Nei(1972,1978) بوسیله نرم افزار GeneAlex محاسبه شده و در جدول ۱۲ آمده است . همانطوریکه ملاحظه می شود بر اساس معیار Nei,(1972) شباهت ژنتیکی میان نمونه های استان خوزستان و بوشهر(۰/۴۸۶) و فاصله ژنتیکی میان نمونه های استان خوزستان و بوشهر(۰/۶۱۵)وجود دارد.

## ۴. بحث و نتیجه گیری

اگرچه امروزه از انواع مختلفی از روشها بمنظور استخراج DNA استفاده می شود. لیکن هنوز جاندارانی هستند که استخراج DNA آنها با سختی و بازدهی پایین انجام می پذیرد. و کاربری برخی روشها در مورد آنها نسبتاً مشکل است. یکی از این تکنیکها، روش فنل – کلروفرم است، که اگرچه در بعضی از جاندارن از کارایی بالایی برخوردار است، اما اساساً ایمنی برای محقق در این روش بسیار پایین است. درتحقیق حاضر ابتدا از روش استخراج DNA با کمک استات سدیم استفاده شد، اما نتایج حاصله موفقیت آمیز نبود، لذا ۲۹ روش مختلف به مدت چهارماه آزمایش شد تا استخراج به کمک CTAB را تغییر داده و از روش ابداعی که برای محقق از سمیت کمتری برخوردار بوده و کاربری آن آسان است، DNA مورد نیاز با کیفیت و کمیت مناسب استخراج گردید (Jaferian and *et al*., 2010). در این تحقیق از ۵ جفت آغازگر استفاده شده برای ماهی راشگوی معمولی، ۳ جفت آنها چندشکلی(پلی مورف) و ۲ جفت آنها تک شکلی(مونومورف) بودند. در هنگام شمارش الگوی باندی در تمامی جایگاه ها دو و در برخی موارد یک باند ضخیم دیده می شد. این باندها در نتیجه وجود جایگاه های همولوگ در شرایط تکثیر واکنش زنجیره ای پلیمراز می باشد. در مقایسه مناطق مورد مطالعه بیشترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به نمونه های استان خوزستان با ۵ آلل می باشد. همچنین بیشترین تعدا آلل موثر مربوط به نمونه های استان بوشهر با ۳/۳۰۶ آلل می باشد. علت این یافته احتمالا به خاطر جریان ژنی بالا در استان بوشهر بعلت دسترسی به آبهای آزاد می باشد. در مقایسه جایگاه های سه گانه، بیشترین تعداد آلل مشاهده شده ۵ آلل در جایگاه Eletet2 می باشد که علت آن احتمالاً به خاطر جهش پذیری این جایگاه و یا وجود آلل های خنثی می باشد. هتروزایگوزسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختار جمعیت گونه ها دارد زیرا تامین کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ به عنوان پاسخی به سازش پذیری در شرایط محیطی است. در مطالعه حاضر دامنه هتروزایگوسیتی مورد انتظار(He ) بین مناطق نمونه برداری در جایگاه های سه گانه بین ۰/۶۷۹- ۰/۳۸۴ با میانگین ۰/۵۳۱ بود. بیشترین مقدار هتروزایگوسیتی مورد در جایگاه Eletet2 در نمونه های استان بوشهر می باشد. بیشترین مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده(Ho)، ۰/۹۲۳ مربوط به جایگاه Eletet16.0 و نمونه های استان بوشهر می باشد. در این بررسی مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده از مقدار هتروزایگوستی مورد انتظار بیشتر می باشد که بیانگر تغییرپذیری ژنتیکی در این ماهی بعلت مهاجرت ها نزدیک و دور و دسترسی به آبهای آزاد(جریان ژنی بالا) می باشد. با وجود این یافته امید است که با گذشت زمان، تنوع ژنتیکی در این ماهی دچار کمترین کاهش باشد.

**تشکرو قدردانی**

* Analysis of Molecular Variance

از زحمات بیدریغ کلیه اعضای هیات علمی و پرسنل مرکز مطالعات و پژوهش های خلیج فارس بویژه جناب مهندس قاسمی، جناب مهندس فخری، جناب مهندس کامیاب و جناب مهندس توسلی کمال تشکر و امتنان را دارم.

## منابع

رجایی، ا.و ق.رجایی.۱۳۸۳.تکنولوژی صنعت وتوسعه شیلات، تازه های کشاورزی، سال پنجم، شماره ۴۱و۴۲، ص ۲۵-۲۱.

قرایی،ا. ،م.پورکاظمی.۱۳۸۰. بررسی تفاوت و شباهت ژنتیکی بین دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی با استفاده از روش RAPD، اولین سمینار ژنتیک و اصلاح نژاد دام طیور و آبزیان کشور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، ص ۷۸-۷۵.

Archangi,B. 2008. Levels and patterns of Genetic diversity in wild and cultured population of Mulloway(Argyrosomus japonicus) using Mitochordial DNA and Microsatellites, PhD thesis, Queensland University of Technology,Pp 77-80& 123-131.

Bagley, M.J., S.E. Franson, S.A. Christ, E.R. Waits, G.P. Toth. 2002. Genetic diversity as an indicator of ecosystem condition and sustainability: utility for regional assessments of stream condition in the eastern united states, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, Pp 3-5.

FAO.1999. The global strategy for the management of farm animal genetic resources: food security for all, FAO, Rome, Italy, Pp 201-205.

Jaferian A., Mohammadi M., Qasemi S.A., Hossini S.J. 2010. A Simple and Efficient Novel Method for DNA Extraction from *Eleutheronema tetradactylum* (Shaw,1804), World Journal of Fish and Marine Sceince, 2(5) 401-403.

Horne, J.B., P. Momigliano, D.T. Welch, S.J. Newman & L.V. Herwerden. 2011. Limited ecological population connectivity suggests low demands on self-recruitment in a tropical inshore marine fish(Eleutheronema tetradactylum : Polynemidae), Molecular Ecology, 20, 2291-2306.

Nei, M. 1996. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics, Annu Rev. Genet; 30:371-403.

Pember, M. B., 2006. Characteristics of fish communities in coastal waters of north-western Australia, including the biology of the threadfin species *Eleutheronema tetradactylum* and *Polydactylus macrochir*, PhD thesis, Murdoch Univ., Australia,Pp 102-109.

Sambrook, J.and Russell D.W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual, CSHL Press, Pp 131-205.