Archive of SID

شناسایی لارو گونه‌های مختلف شوورت ماهیان (Perciformes: Sillaginidae) در خلیج فارس، با روش‌های ریخت شناسی و خط شناسه گذاری DNA

محمد امینی[1*]، رسول قربانی[1]، علی شعبانی[1]، مهناز ربانی‌ها[2]، محسن نوری‌نژاد[3]، رحمت ندافی[4]، حامد کلنگی میاندره[1]

mamini57@yahoo.comm

۱- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران
۳- پژوهشکده میگوی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور ، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی، بوشهر
۴- دانشگاه علوم کشاورزی سوئد

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۴

چکیده

شوورت ماهیان یکی از خانواده‌های مهم آب‌های ساحلی خلیج فارس می‌باشند که شناسایی لاروهای آن به دلیل شباهت فراوان بسیار دشوار است. در این مطالعه در مجموع ۴۱۹۵ عدد لارو خانواده شوورت ماهیان با استفاده از تور دوقلو بونگو از پنج خور شیف، لشکری، رمله، فراکه، دوبه و یک ایستگاه ساحلی، در استان بوشهر جمع‌آوری شد. جهت شناسایی لاروها از دو روش ریخت‌شناسی و ژنتیکی استفاده گردید. در ابتدا نمونه‌ها بر اساس تعداد میومر به دو دسته ۳۴ یا ۳۸ میومری تفکیک شدند. بر این اساس لاروهای دارای ۳۴ میومر گونه *Sillago sihama* شناسایی شدند. جهت شناسایی نمونه‌های ۳۸ میومری ۱۲ عدد لارو مرحله پس‌خمیدگی انتخاب شد و از ویژگی‌های ریختی مانند تعداد شعاع باله پشتی و مخرجی به همراه روش خط شناسه گذاری DNA ژن COI و مطابقت با سایت NCBI بهره گرفته شد. با توجه به ویژگی‌های ریخت‌شناسی دو گونه *Sillago arabica* و *Sillago attenuata* شناسایی شدند. مطالعات ژنتیکی با استفاده از تعیین توالی ۶۲۵ جفت باز از ژن COI انجام شد. فواصل ژنتیکی محاسبه شده با مدل K2P بین دو گونه اخیر ۱۸٪ تا ۱۹/۷٪ به دست آمد که نشان می‌دهد نتایج خط شناسه گذاری، نتایج ریخت‌شناسی را تأیید نموده و می‌توان از این روش برای شناسایی لاروهای مراحل ابتدایی‌تر که فاقد شعاع مشخص باله و غیرقابل شناسایی با روش ریختی هستند، استفاده نمود.

لغات کلیدی: سیتوکروم اکسیداز ۱، شناسایی ماهی، *Sillago arabica*، *Sillago attenuata*، *Sillago sihama*

*نویسنده مسئول

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

شوورت ماهیان Sillaginidae از ماهیان شاخص مناطق ساحلی بوده و تعداد گونه‌های بسیار کمی از آنها در آب-های تا حدود ۱۸۰ متر یافت می‌شوند (McKay, 1992). این خانواده متعلق به راسته سوف ماهی شکلان Perciformes و زیرراسته Percoidei می‌باشند (Kaga, 2013). افراد این خانواده در اقیانوس هند و غرب اقیانوس آرام دیده می‌شوند (Nelson, 2006). این خانواده در آب‌های ساحلی جنوب ایران نیز بسیار فراوان است و در اغلب بررسی‌های ایکتیوپلانکتونی سواحل ایرانی خلیج فارس لارو آن جزء فراوان‌ترین خانواده‌ها گزارش شده است (ربانی‌ها ۱۳۸۱ و ۱۳۸۷؛ دهقان و اسکندری، ۱۳۷۹؛ ابراهیمی، ۱۳۸۳؛ Koochaknejad *et al*., 2011). عمده گونه‌ها اندازه کوچک تا متوسط دارند و کیفیت گوشت آنها بسیار مطلوب است. هرچند در صید تجاری و صنعتی توجه جدی به آنها نمی‌شود ولی از ماهیان مورد علاقه ماهیگیران تفریحی و ورزشی سواحل دریاها هستند (McKay, 1992).

مطابق بررسی‌های Kaga (2013) و Eschmeyer and Fong (2015) این خانواده دارای ۵ جنس و ۳۴ گونه است. چهار گونه شوورت ماهی موجود در آب‌های جنوب ایران عبارتند از *Sillago sihama*، *S. attenuata*، *S. arabica* و *Sillaginopodys chondropus* (McKay, 1992; Richards, 2008; www.fishbase.org, 2015). دو گونه *S. attenuata* و *S. arabica* بومی خلیج فارس هستند (Richards, 2008). شناسایی گونه‌های این خانواده به دلیل شباهت زیاد ریختی و رنگدانه‌ای آنها بسیار سخت و مبهم است (McKay, 1992) که این سختی در مورد لاروها دوچندان می‌شود، به دلیل اینکه لارو نسبت به ماهی بالغ صفات قابل اندازه‌گیری و شمارشی کمتری دارد، به ویژه در مراحل اولیه خروج از تخم. این باعث می‌شود لاروها به اشتباه در گونه، جنس یا حتی خانواده متفاوتی شناسایی و دسته‌بندی شده و مشکلات زیادی در تفسیر و نتیجه‌گیری از پژوهش‌های انجام شده ایجاد شود. خصوصیات عمومی لاروهای این خانواده عبارت است از: تعداد میومر[1] ۴۰-۳۳، بدن طویل، کیسه هوا نامشخص در روز، روده ابتدا مستقیم ولی در خلال مرحله خمیدگی (Flexion) پیچ می‌خورد، خارهای سری کاملاً تحلیل رفته، باله پشتی و مخرجی تقریباً یک اندازه، الگوی رنگدانه‌ای متمایز با دیگر خانواده-های مشابه از نظر ریختی، به ویژه ردیف رنگدانه ستاره‌ای شکل در لبه خط شکمی و پشتی بدن و دم که ردیف پشتی معمولاً در مرحله خمیدگی ناپدید می‌شود (Leis and Carson-Ewart 2000). دو گونه *S. arabica* و *S. attenuata* دارای ۴۰-۳۷ میومر و گونه *S. sihama* و *S. chondropus* به ترتیب دارای ۳۴ و ۳۵ میومر هستند. لازم به ذکر است با وجود گزارش وجود چهار گونه از شوورت ماهیان در آب‌های ایران (McKay, 1992; Richards, 2008; www.fishbase.org, 2015)، در همه مطالعات انجام شده در آب‌های جنوب ایران، گونه مورد بررسی *S. sihama* ذکر شده است (حسین‌زاده صحافی و همکاران، ۱۳۸۰؛ لیراوی، ۱۳۹۱؛ علیزاده و همکاران، ۱۳۹۳؛ Mirzaei, *et al*., 2013). از طرفی شادی و همکاران (۱۳۹۳) با بکارگیری نشانگرهای ریزماهواره بیان می‌کنند که تنوع بین نمونه‌ها بسیار بیشتر از تنوع موجود در جمعیت‌های مختلف بوده و احتمال وجود گونه‌های متفاوت در ماهیان صید شده بسیار بالاست.

در سال‌های اخیر روش‌های ژنتیکی به دلیل کارایی بالا در پاسخ‌گویی به پرسش‌های بوم‌شناختی و زیست‌شناسی، گسترش زیادی یافته‌اند. به‌تازگی روش خط شناسه گذاری DNA (DNA Barcoding) و ژن زیرواحد I سیتوکروم اکسیداز (Cytochrome Oxidase subunit I) با ۶۴۸ جفت باز برای تشخیص گروه‌های گیج‌کننده تا سطح گونه مورد توجه قرار گرفته است و می‌تواند در کنار روش‌های ریخت‌شناسی استفاده شود (Gao *et al*., 2011). این روش برای شناسایی لارو ماهیان نیز ابزار مفیدی معرفی شده است (Hubert *et al*., 2010; Ward *et al*., 2005). مزیت عمده استفاده از COI آن است که علی رغم کوتاهی این ژن و تعیین توالی سریع و ارزان آن، به دلیل استاندارد و به

1- Myomere

www.SID.ir

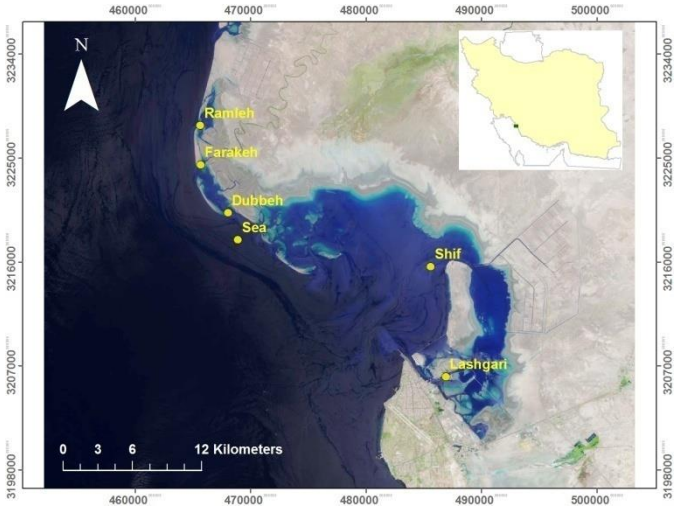
Archive of SID

خوبی شناخته شده بودن، اطلاعات کافی را برای شناسایی و تفکیک گونه‌های نزدیک فراهم می‌آورد (Hebert *et al*, 2003).

با تعیین زمان و مکان حضور لارو هر گونه در آب‌ها می‌توان فصل و مکان مناسب تخم‌ریزی آن گونه را تعیین نمود. در واقع دانستن پراکنش زمانی و مکانی لاروها می‌تواند اطلاعات پایه برای ارزیابی و مدیریت ذخایر فراهم نماید. از این رو شناخت دقیق و تفکیک گونه‌های لارو ماهی می‌تواند وضعیت تولید مثلی و بازسازی ذخائر هر گونه را با اطمینان بالا مشخص نماید. این تحقیق با هدف تفکیک گونه‌های لارو شوورت ماهی در سواحل و خوریات مرکزی استان بوشهر انجام شد. در این پژوهش فرض شد که روش خط شناسه گذاری DNA و ریخت‌شناسی منطبق بر هم بوده و می‌توانند برای شناسایی لارو شوورت ماهیان استفاده شوند.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری در سواحل شمالی خلیج فارس، محدوده مرکزی استان بوشهر در خورهای فراکه، شیف، لشگری، دوبه، رمله و یک ایستگاه دریایی انجام شد (شکل ۱).



شکل ۱: موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری در منطقه مورد مطالعه

لاروها با استفاده از تور دو قلو بونگو (Bongo-net, Hydrobios^{TM}) با دهانه ۶۰ سانتی‌متر و چشمه ۳۰۰ میکرون هر دو ماه یک بار جمع‌آوری شدند. در هر ایستگاه ابتدا عمق منطقه با عمق‌یاب اندازه‌گیری شده و سپس بر اساس آن و محاسبه طول سیم، تور به کف ارسال و کشش به‌صورت مورب انجام شد. توراندازی با استفاده از قایق فایبرگلاس و با کمک وینچ دستی با حرکت ملایم شناور و با حفظ زاویه کشش (۴۵ درجه) صورت گرفت (ربانی‌ها، ۱۳۸۱). پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، محتویات یکی از تورها در فرمالین ۵٪ و دیگری برای آزمایش‌های ژنتیکی در الکل اتیلیک ۹۵٪ تثبیت شدند (Webb *et al*., 2006; Di´az-Viloria *et al*., 2005; Hubert *et al*., 2010). نمونه‌ها بعد از انتقال به آزمایشگاه جداسازی شدند. سپس نمونه‌ها شمارش و شناسایی شده و در نهایت به‌منظور نگهداری آنها، محلول الکل اتانول ۹۶٪ استفاده شد. شناسایی لاروها با استفاده از کلیدهای شناسایی و منابع موجود انجام شد (Leis and Carson-Ewart, 2000; Richards, 2008; Konishi, *et al*., 2012).

خصوصیات شمارشی که در شناسایی لارو ماهیان مورد بررسی قرار گرفت عبارتند از: تعداد خطوط ماهیچه‌ای یا میومرها، تعداد شعاع‌های باله‌های پشتی، مخرجی، سینه‌ای و شکمی (در صورت وجود). ویژگی‌های شمارشی گونه‌های موجود در خلیج فارس در جدول ۱ ارائه شده

www.SID.ir

Archive of SID

است. همچنین از اختصاصات ظاهری، به نوع الگوی رنگدانه‌ای، پوشش خار در ناحیه سر، دندان‌ها و شکل چشم که طی روند رشد و تکامل و مراحل نوزادی دارای تغییرات هستند، می‌توان اشاره نمود.

جدول ۱: ویژگی‌های شمارشی گونه‌های شوورت ماهی آب‌های خلیج فارس و خلیج عمان (McKay, 1992; Richards, 2008; www.fishbase.org, 2015).

جنس	گونه	شعاع باله				
		پشتی	مخرجی	سینه‌ای	مهره	خار آبششی
Sillago	*sihama*	XI+I,20-23	II,21-23	16-17	14+20=34	+8-10
	attenuata	XII-XIII+I,19-21	II,18-20		15+22=37-39	
	arabica	XII-XIII+I,22-24	II,22-24		15-16+22-23=38-40	
Sillaginopodys	*chondropus*	XII-XIII,20-21	II,22-23		12-13+22-23=35	

استخراج DNA و واکنش زنجیره پلی مرازی (PCR)

۱۲ عدد لارو با توجه به مشخصات ظاهری شناسایی شدند و DNA آنها با استفاده از کیت Exgene^{TM} Cell SV (GeneAll$^{®}$, Korea) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراجی با استفاده از روش الکتروفورز افقی ژل آگارز ۱ ٪ و اسپکتوفتومتری انجام شد. DNA استخراج شده به عنوان الگو برای واکنش PCR به‌کار رفت. برای تکثیر ژن COI، پرایمرهای یونیورسال ماهیان F1 Fish (5'-TCAACCAACCACAAAGACATT-3') و R1 Fish (5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATC-3') استفاده شد (Ivanova, 2007; Becker et al., 2011).

ابتدا تمامی نمونه ها با واکنش PCR معمولی در حجم کم چک شدند . پس از حصول نتایج پیش بینی شده واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد. مواد استفاده شده در این واکنش عبارت بود از ۲۵ میکرولیتر ماسترمیکس، ۱۰ پیکومول آغازگر رفت و ۱۰ پیکومول آغازگر برگشت، ۲۰ میکرولیتر آب مقطر و چهار میکرولیتر DNA الگو. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس برای سه دقیقه، به دنبال آن سی و پنج چرخه (واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۶۴ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه) و در نهایت، گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود. برای اطمینان از تکثیر ناحیه مورد نظر ۵ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز ۱ ٪ بارگذاری (الکتروفورز) و توسط اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شد، سپس در معرض تابش نور U.V قرار داده شد و باندهای حاصل از تکثیر قطعه مورد نظر توسط چرخه PCR مشاهده شد.

توالی یابی

محصول PCR جهت خالص‌سازی و توالی‌یابی به شرکت بایونیر کره جنوبی (Bioneer, Inc, Daejeon, Korea) ارسال شد. قطعه تکثیر شده از دو جهت مستقیم و معکوس به همراه تکرار، توالی یابی شد. پیک های ایجاد شده توسط توالی یاب با دقت توسط نرم افزار های مرتبط (Bioedite , MEGA) به منظور ارزیابی کیفیت توالی بررسی و هم‌ردیف (Align) شدند (Hall, 1999; Tamura, 2013). بعد از اطمینان از صحت توالی ها، فرایند ترکیب (Combination) توالی‌های مستقیم ومعکوس از هر نمونه با استفاده از نرم افزار Bioedite صورت پذیرفت. توالی های بدست آمده جهت تعیین فاصله نوکلئوتیدی، مقایسه نوکلئوتیدها و تعیین روابط تبارشناسی با نرم‌افزار MEGA6 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به منظورتعیین فاصله نوکلئوتیدی و تعیین روابط تبارشناسی از روش Neighbor joining (NJ) و از مدل K2P (Kimura 2-Parameter) استفاده شد. توالی COI گونه‌های شوورت ماهی موجود

www.SID.ir

Archive of SID

در منطقه یعنی *Sillago sihama* (با شماره دسترسی HQ561464.1) و *Sillaginopodys chondropus* (*Sillago*) (JF494511.1) و دو گونه از گاوماهیان منطقه یعنی *Glossogobius giuris* (با شماره دسترسی JX983307.1) و *Scartelaos histophorus* (با شماره دسترسی FJ238032.1) به عنوان گروه خارجی (out group) با فرمت FASTA از NCBI (National Center for Biotechnology Information) استخراج و در کنار توالی‌های بدست آمده بررسی شد. همچنین به منظور تعیین هومولوژی توالی‌های بدست آمده با دیگر گونه‌ها، در سایت NCBI فرایندBLAST انجام و صحت توالی ها و عملکرد پرایمر هاتایید شدند.

نتایج

در نمونه‌های جمع‌آوری شده با توجه به تعداد میومر دو گروه تشخیص داده شدند: یک گروه دارای ۳۴ میومر و گروه دیگر دارای ۳۸ میومر (شکل ۲). با توجه به اطلاعات جدول ۱ نمونه‌های دارای ۳۴ میومر گونه *S. sihama* شناسایی شدند.گروه دارای ۳۸ میومر بر اساس تعداد شعاع‌های باله پشتی و مخرجی مورد بررسی قرار گرفتند تا تفکیک بین دو گونه‌ی *S. arabica* و *S. attenuata* صورت پذیرد. این باله ها در لاروهای مرحله پس‌خمیدگی (Postflexion) قابل مشاهده و شمارش هستند. بنابراین شش عدد از هر کدام از این دو گونه و در مجموع ۱۲ عدد لارو در مرحله پس‌خمیدگی در آزمایش‌های ژنتیکی استفاده شد.

شکل ۲: نمونه‌های لارو شوورت ماهیان، چپ: گروه دارای ۳۸ میومر، راست: گروه دارای ۳۴ میومر

به دلیل کوچک بودن لاروها تنها از شش عدد از آنها DNA با کمیت و کیفیت مناسب بدست آمد که برای تکثیر ژن COI در مرحله بعد (PCR) استفاده شدند. تکثیر ناحیه COI، توالی‌هایی به طول حدود ۶۸۲ جفت باز فراهم نمود.

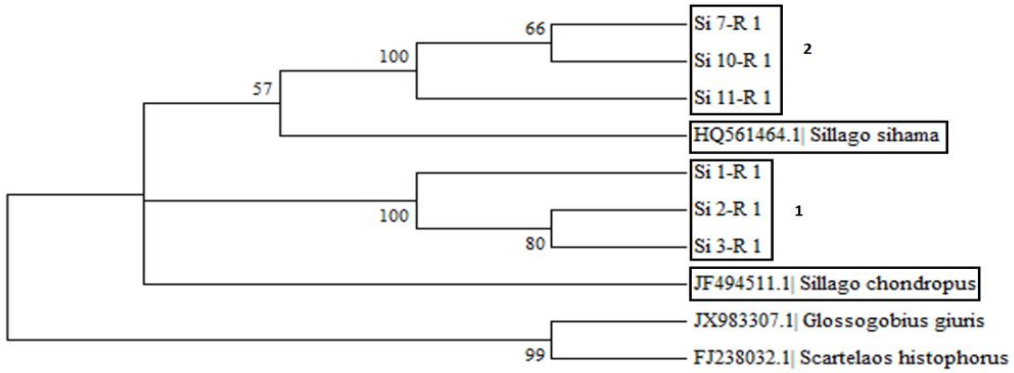
نتایج BLAST نشان داد که سه نمونه ۱، ۲ و ۳ بیشترین شباهت را با *Sillago* sp. (با شماره دسترسی KC858287.1 و KC858288.1) به میزان حدود ۸۶ درصد شباهت (Identity) داشتند. نمونه‌های ۷، ۱۰ و ۱۱ نیز با *S. analis* (شماره دسترسی JX875478.1) و *S. ciliata* (شماره دسترسی JX887790.1) به میزان حدود ۸۵ درصد شباهت داشتند. درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA و با روش NJ برای نمونه های مورد مطالعه و گروه خارجی با استفاده از ۶۲۵ جفت باز ترسیم شد (شکل ۳).

مطابق شکل ۳ نمونه‌های ۱، ۲ و ۳، نمونه‌های ۷، ۱۰ و ۱۱، و هر کدام از گونه‌های *S. sihama* و *S. chondropus* در یک Clad جداگانه قرار گرفتند. درخت فیلوژنی نیز توانست دو گروه نمونه را تفکیک نماید. از طرفی درخت فیلوژنی نمونه‌های تحقیق حاضر را از دیگر گونه‌های موجود در منطقه که قبلاً در پایگاه NCBI ثبت شده بودند، متمایز نشان داد.

فواصل ژنتیکی جفتی برای نمونه‌ها و گونه‌های شوورت موجود در منطقه با روش K2P بدست آمد (جدول ۲). دامنه فاصله ژنتیکی برای نمونه‌های ۱، ۲ و ۳ (گروه ۱) با یکدیگر ۰/۲٪ تا ۰/۹٪، نمونه‌های ۷، ۱۰ و ۱۱ (گروه ۲) با یکدیگر ۰/۲٪ تا ۰/۵٪، بین گروه ۱ و ۲ برابر ۱۸٪ تا ۱۹/۷٪، و دو گروه ۱ و ۲ با *S. sihama* و *S.chondropus* بین ۲۰٪ تا ۲۲/۷٪ بود.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: درخت فیلوژنی ترسیم شده به روش Neighbor joining (NJ) با استفاده از ژن COI

جدول ۲: فواصل ژنتیکی جفتی برای نمونه‌ها و گونه‌های شوورت موجود در منطقه با روش K2P

نمونه	Si 1	Si 2	Si 3	Si 7	Si 10	Si 11	*S. sihama*	*S. chondropus*
Si 1	۰							
Si 2	۰/۰۰۹	۰						
Si 3	۰/۰۰۷	۰/۰۰۲	۰					
Si 7	۰/۱۹۵	۰/۱۸۵	۰/۱۸۵	۰				
Si 10	۰/۱۹۷	۰/۱۸۸	۰/۱۸۸	۰/۰۰۲	۰			
Si 11	۰/۱۹۰	۰/۱۸۰	۰/۱۸۰	۰/۰۰۳	۰/۰۰۵	۰		
S. sihama	۰/۲۲۷	۰/۲۲۵	۰/۲۲۵	۰/۲۰۰	۰/۲۰۲	۰/۲۰۵	۰	
S. chondropus	۰/۲۰۰	۰/۲۰۲	۰/۲۰۲	۰/۲۰۲	۰/۲۰۲	۰/۲۰۲	۰/۲۲۸	۰

بحث

شناسایی لارو خانواده شوورت ماهیان در حد گونه بسیار مشکل است. در این خانواده الگوی رنگدانه‌ای خاصی در سطح گونه مشاهده نشد و همه گونه‌ها دارای یک ردیف رنگدانه‌ای شکمی و پشتی بودند که با رشد لارو به تدریج ناپدید می‌شد. بنابراین این ویژگی برای شناسایی گونه‌ها قابل استفده نبود و فقط برای شناسایی در سطح خانواده کاربرد خواهد داشت. الگوی رنگدانه‌ای در این خانواده معمولاً یکسان است و فقط در مراحل مختلف رشد لارو تغییر می‌کند (Leis and Carson-Ewart, 2000). از طرفی تعداد شعاع باله پشتی که در این پژوهش برای تفکیک لاروهای دارای ۳۸ میومر استفاده شد فقط در لاروهای بزرگ‌تر یعنی مرحله پس‌خمیدگی قابل مشاهده است. در لاروهای کوچک‌تر که معمولاً در نمونه‌برداری‌ها تعداد بیشتری نیز به خود اختصاص می‌دهند، تنها صفت قابل بررسی برای شناسایی این لاروها تعداد میومرها می‌باشد. تعداد میومر در دو گونه *S. Arabica* و *S. attenuate* همپوشانی دارد. بنابراین خط شناسه گذاری DNA بهترین ابزار برای شناسایی آنها خواهد بود. علاوه براین این روش می‌تواند تا حد زیادی قرابت فیلوژنی گونه‌ها را نیز مشخص کرده و برای حل مشکلات تاکسونومیک مورد استفاده قرار گیرد (Hebert, et al., 2003).

با بررسی منابع مختلف مربوط به لارو ماهیان در سواحل خلیج فارس (ربانی‌ها ۱۳۸۱ و ۱۳۸۷؛ دهقان و اسکندری، ۱۳۷۹؛ ابراهیمی، ۱۳۸۳؛ Koochaknejad *et al.* 2011) می‌توان گفت که این خانواده در همه سواحل جنوبی ایران وجود دارد، اگرچه به نظر می‌رسد در استان بوشهر به دلیل وجود تعداد زیاد خورهای کوچک و بزرگ و سواحل ماسه‌ای و گلی مناسب، فراوانی بیشتری دارد. این خانواده دارای اهمیت بوم‌شناختی و شیلاتی فراوانی بوده و می‌تواند در صید تفریحی و به دلیل رشد سریع به

www.SID.ir

Archive of SID

عنوان گزینه‌ای برای آبزی‌پروری مطرح باشد (Mirzaei, *et al.*, 2013). تاکنون نمونه‌های بالغ موضوع پژوهش-های وسیعی با موضوع زیست‌شناسی تولید مثل یا پویایی جمعیت بوده است (حسین‌زاده صحافی و همکاران، ۱۳۸۰؛ لیراوی، ۱۳۹۱؛ علیزاده و همکاران، ۱۳۹۳ ;Mirzaei, *et al.*, 2013). در همه این مطالعات گونه مورد بررسی *S. sihama* ذکر شده است.

با مقایسه نتایج BLAST توالی‌های بدست آمده در پژوهش حاضر، می‌توان دید که دو گروه نمونه موجود با هیچ گونه مشخص ثبت شده در این پایگاه مطابقت ندارد. زیرا نتیجه در مورد گروه اول (نمونه‌های ۱، ۲ و ۳) با جنس *Sillago* با شباهت۸۶٪ بدست آمد. در مورد گروه دوم نیز با دو گونه *S. analis* و *S. ciliata* شباهت۸۵٪ بدست آمد، در حالی‌که پراکنش این دو گونه محدود به استرالیا بوده و در سواحل ایران وجود ندارند (McKay, 1992). یکی از معایب این روش در مورد یک خط شناسه جدید نمایان می‌شود، در این زمان سیستم BLAST قادر نیست توالی مذکور را به عنوان یک گونه جدید معرفی کند و توالی ناشناخته را به گونه‌ای که بیشترین شباهت را به آن دارد، نسبت می‌دهد. نتایج درخت فیلوژنتیک نشان داد که دو گروه نمونه مذکور با نمونه-های گرفته شده از NCBI متفاوت بوده و در گروه‌های مجزا قرار می‌گیرند. طبق Hebert *et al.*, (2004) و Steinke *et al.*, (2009) فاصله ژنتیکی بیش از ۳٪ نمی‌تواند مربوط به تنوع داخل گونه‌ای و بین جمعیت‌ها باشد و بیش از این مقدار به عنوان گونه جدا شناخته خواهد شد. Ward *et al.*, (2005) برای ماهیان استرالیا فاصله ژنتیکی متوسط (K2P) برای سطوح داخل گونه، جنس، خانواده، راسته و رده را به ترتیب ۰/۳۹٪، ۹/۹۳٪، ۱۵/۴۶٪، ۲۲/۱۸٪، و ۲۳/۲۷٪ بدست آورند. بنابراین دو گروه نمونه پژوهش حاضر قطعاً با یکدیگر و با گونه‌های *S. sihama* و *S. chondropus* متفاوت‌اند. با توجه با تعداد شعاع باله‌های پشتی و مخرجی، گروه اول لاروها (نمونه‌های ۱، ۲ و ۳) گونه *S. arabica* و گروه دوم (نمونه‌های ۷، ۱۰ و ۱۱) *S. attenuata* می‌باشند و نتایج خط شناسه گذاری DNA نتایج ریخت‌شناسی را کاملاً تأیید می‌نماید. هنگامی که لارو این گونه‌ها وجود دارد ماهیان بالغ نیز وجود خواهند داشت. زیرا این خانواده از ماهیان وابسته به سواحل بوده و مهاجرت مشخصی ندارند (McKay, 1992). بنابراین احتمال اینکه ماهی بالغ تخمریزی نموده و به مناطق دیگر مهاجرت کند بسیار کم است. از طرفی منطقه نمونه برداری کاملاً ساحلی بوده و تحت تأثیر جریان‌های آبی خاص و قوی وجود ندارد. بنابراین حضور لاروها نمی‌تواند به دلیل مهاجرت آنها از محل‌های تخمریزی دورتر به منطقه باشد.

در مجموع می‌توان گفت در سواحل و خورهای مورد بررسی سه گونه از خانواده شوورت ماهیان حضور دارند که محققین باید با توجه به شباهت زیاد آنها، در شناسایی آنها دقت فراوانی نمایند. زیرا شناسایی نادرست می‌تواند در تفسیر نتایج پژوهش مشکلات جدی ایجاد نماید. به عنوان مثال در پژوهش حاضر نمونه‌های *S. sihama* در ماه‌های خرداد و تیر، *S. attenuata* در ماه‌های اسفند و فروردین و نمونه‌های *S. arabica* در اواخر پاییز صید شدند. این نشان‌دهنده فصل تخمریزی متفاوت ماهیان بالغ می‌باشد. ولی در هریک از مطالعات انجام شده در آبهای جنوب ایران دو زمان اوج تولید مثلی یا زمان اوج تولید مثلی متفاوت برای گونه *S. sihama* ذکر نموده‌اند. Mirzaei, *et al.*, (2013) فصل تولید مثل این گونه را در استان هرمزگان (بندر عباس و بندر جاسک) دارای یک نقطه اوج و از فروردین تا خرداد ذکر می‌نماید، در حالیکه علی‌زاده و همکاران (۱۳۹۳) در همین استان (محدوده جزیره هرمز تا کشتی سوخته) فصل تولیم مثل این گونه را دارای دو نقطه اوج، دی ماه و اسفند ماه بیان می‌نمایند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان لازم می‌دانند از همه پرسنل پژوهشکده میگو کشور بویژه آقای رسول غلام‌نژاد برای همکاری در نمونه-برداری لاروها و خانم‌ها دکتر سمیرا ناظم رعایا و مهندس معصومه حسینی جهت همکاری در انجام آزمایش‌های ژنتیکی تشکر نمایند.

منابع

ابراهیمی، م.، ۱۳۸۳. بررسی هیدرولوژی و هیدروبیولوژی خلیج فارس (آب‌های محدوده استان هرمزگان). مؤسسه تحقیقات شیلات ایران ـ

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان. ۱۳۰ صفحه.

دهقان مدیسه، س. و اسکندری، غ.ر.، ۱۳۷۹. فراوانی و تنوع ایکتیوپلانکتون‌های سواحل غربی خوزستان. مرکز تحقیقات آبزی پروری جنوب کشور. ۸۴ ص.

لیراوی، ع.، ۱۳۹۱. بررسی برخی خصوصیات زیستی ماهی شوورت *Sillago sihama* (Forskal, 1775)در آب‌های خلیج فارس (سواحل غربی استان بوشهر). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

ربانی‌ها، م.، ۱۳۸۱. بررسی فراوانی و تنوع لارو ماهیان در سواحل شمالی استان بوشهر (خور- مصب فراکه تا بندر گناوه). پایان نامه کارشناسی ارشد- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی، ۹۹ صفحه.

ربانی‌ها، م.، ۱۳۸۷. شناسایی، تنوع و الگوی پراکنش لارو ماهیان در اکوسیستم جزایر مرجانی خارگ و خارکو – خلیج فارس با بکارگیری روش سامانه اطلاعات جغرافیایی (GIS). پایان نامه دکترا تخصصی – دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، ۳۱۶ صفحه.

شادی، ا.، ذوالقرنین، ح.، سالاری علی‌آبادی، م. ع.، نبوی، م. ب.، و رونق، م. ت.، ۱۳۹۳. ساختار ژنتیکی ماهی شوورت در سواحل هرمزگان با بکارگیری نشانگر ریزماهواره. مجله علوم و فنون دریایی، دوره ۱۳، شماره ۲، ص ۱۰-۱.

حسین‌زاده صحافی، ه.، سلطانی، م.، و دادور، ف.، ۱۳۸۰. زیست‌شناسی تولید مثل ماهی شوورت (*Sillago sihama*) در خلیج فارس. مجله علمی شیلات ایران، سال ۱۰، شماره ۱، ص ۵۴-۳۷.

Becker, S., Hanner, R., and Steinke, D., 2011. Five years of FISH-BOL: Brief status report. Mitochondrial DNA, 22: 3-9.

Di´az-Viloria N., Sa´nchez-Velasco L. & Perez-Enriquez R., 2005. Inhibition of DNA amplification in marine fish larvae preserved in formalin. Journal of Plankton Research, Vol. 27, No. 8: 787–792.

Eschmeyer, W.N. and Fong, J.D., 2015. Species by Family/Subfamily. http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp. Cited 5 May, 2015.

FishBase. 2015. www.fishbase.org, Cited 5 May, 2015.

Gao, T.X., Ji, D.P., Xiao, Y.S., Xue, T.Q., Yanagimoto, T., and Setoguma, T., 2011. Description and DNA barcoding of a new *Sillago* species, *Sillago sinica* (Perciformes: Sillaginidae), from coastal waters of China. Zoological Studies 50(2): 254-263.

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

Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemlak, T.S., and Francis, C.M., 2004. Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biol 2:1657-1663.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S. L., and deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B 270, 313–321.

Hubert, N., Delrieu-Trottin, E., Irisson, J.O., Meyer, C. and Planes, S., 2010. Identifying coral reef fish larvae through DNA barcoding: A test case with the families Acanthuridae and Holocentridae. Molecular Phylogenetics and Evolution 55: 1195–1203.

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

www.SID.ir

Archive of SID

Kaga,T., 2013. Phylogenetic systematics of the family Sillaginidae (Percomorpha: order Perciformes). Zootaxa 3642 (1): 001–105.

Konishi, y., Chayakul, R., Chamchang, C., and Duangdee, T., 2012. Early Stages of Marine Fishes in Southeast Asian Region. Southeast Asian Fisheries Development Center, Thailand, 275 pp.

Koochaknejad, E., Savari A., Dehghan-Madiseh S., Eskandari G., and Sakhaiee, N., 2011. Fish larvae assemblage in the northwestern coast of the Persian Gulf Khure Mussa Channel. Journal of the Persian Gulf (Marine Science) 2: 25-29.

Leis J.M. & Carson-Ewart B.M., 2000. The larvae of Indo-Pacific coastal fishes (An identification guide to marine fish larvae). Brill, 850p.

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. No. 125, Vol. 14. 1992. 87 p.

Mirzaei, M.R., Valinasab, T., Yasin, Z., and Hwai, A.T.S., 2013. Reproduction characteristics and length- weight relationships of the sand whiting (*Sillago sihama*) in the south coastal of Iran (Persian Gulf and Oman Sea). Annals of Biological Research, 4 (5):269-278.

Nelson J.S., 2006. Fishes of the World. John Wiley & Sons, New York, 601p.

Richards, W.J., 2008. Identification Guide of the Early Life History Stages of Fishes from the Waters of Kuwait in the [Persian] Gulf, Indian Ocean. Kuwait Institute for Scientific Research, 330 p.

Steinke, D., Zemlak, T.S., and Hebert, P.D.N., 2009. Barcoding Nemo: DNA-Based Identifications for the Ornamental Fish Trade. PLoS ONE 4(7): e6300.

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.

Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., and Hebert, P.D.N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Phil. Trans. R. Soc. B 360, 1847–1857.

Webb K.E., Barnes D.K.A., Clark M.S. & Bowden D.A., 2006. DNA barcoding, a molecular tool to identify Antarctic marine larvae. Deep-Sea Research II 53: 1053–1060.

www.SID.ir

Archive of SID

Species identification of Sillaginid larvae (Perciformes: Sillaginidae) in the central creeks of Bushehr province – Persian Gulf using morphological and DNA barcoding mothods

Amini M.[1]; Ghorbani R.[1]; Shabani A.[1]; Rabbaniha M.[2]; Noorinejad M.[3]; Naddafi R.[4] and Kolangi-Miandare H.[1]

mamini57@yahoo.com

1- Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2- Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Tehran, Iran
3- Shrimp Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization
4- Swedish University of Agricultural Sciences

Keywords: cytochrome oxidase subunit I, fish identification, *Sillago arabica*, *Sillago attenuata*, *Sillago sihama*

Abstract

Sillaginids are one of the important fishes in coastal waters of Persian Gulf, whose larvae of different species are morphologically very similar to each other and identification of them to species level is very difficult. In this study a total of 4195 Sillaginidae larvae were collected from five inlets (Shif, Lashkari, Ramleh, Dubbeh, Farakeh) and one sampling site in the coastal area of Bushehr Province using a Bongo-net. Morphological and genetic methods were used to identity larvae of this family. The larvae were morphologically divided into two groups, depending on 34 or 38 myomers. The larvae with 34 myomeres were identified as *Sillago sihama*. To identify larvae with 38 myomers, 12 individuals of postflexion larvae were selected and the morphological characteristics such as number of dorsal and anal fins as well as DNA barcoding of COI were used. According to morphological characteristics, the larvae were divided into two species; *Sillago arabica* and *Sillago attenuata*. Genetic studies were done by sequencing of 625 base pair of COI gene. Genetic distances calculated using K2P model between these two species was 18% to 19.7% which indicate that DNA barcoding confirms morphological method and it can be used for identifying younger larvae whose fin rays have not been developed and are unidentifiable with morphological methods.

* Corresponding author

www.SID.ir