تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال هفتم، شماره بیست و پنجم، زمستان ۱۳۹۴، صفحه ۱۳-۲۴
دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۸/۱۲ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۱۲/۲۲

DNA بارکدینگ گونه‌های گل‌خورک‌ماهی (*Boleophthalmus dussumeri*، *Periophthalmus waltoni* و *Scartelaos teneus*) در سواحل استان بوشهر

سید احمد قاسمی [۱]*، عبدالعلی موحدی‌نیا [۱]، نگین سلامات [۱] و بهرام کاظمی [۲]
[۱] گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوس‌شناسی، دانشگاه علوم فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
[۲] دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

گل‌خورک‌ماهیان از نظر مطالعات بیولوژیک و اکوتوکسیکولوژیک دارای اهمیت هستند و قابلیت معرفی به عنوان نشانگر زیستی برای پایش محیط‌زیست و بررسی اکوسیستم‌های گلی و مانگرو در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری را دارند. برای شناسایی دقیق گونه‌های گل‌خورک موجود در آب‌های سواحل بوشهر از روش بارکدینگ استفاده شد. این روش، قابلیت شناسایی سریع ویژگی‌های تاکسونومی گونه‌ها را دارد و اطلاعات فراوانی را در این زمینه ارایه می‌نماید. نمونه‌های گل‌خورک از چهار ناحیه: گناوه، جزیره شیف، دلوار و مند در استان بوشهر جمع‌آوری و بررسی شد. سه گونه: *Boleophthalmus dussumeri*، *Periophthalmus waltoni* و *Scartelaos teneus* از نظر مورفولوژیک، شناسایی شد. به منظور بارکدینگ، ناحیه سیتوکروم اکسیداز C میتوکندریایی در ماهی گل‌خورک توالی‌یابی شد. آنالیز توالی COI مربوط به ده نمونه از هر گونه نشان داد که سه گونه *B. dussumeri*، *P. waltoni* و *S. teneus* با اختلاف ژنتیکی (۱۷/۸ درصد) وجود دارد که بیشترین اختلاف ژنتیکی مربوط به دو گونه *B. dussumeri* و *P. waltoni* به میزان ۱۹/۱ درصد وکمترین اختلاف ژنتیکی مربوط به دو گونه *P. waltoni* و *S. teneus* به میزان ۱۱/۸ درصد بود. این میزان از اختلاف ژنتیکی، وجود سه گونه از ماهیان گل‌خورک در سواحل استان بوشهر را تأیید می‌کند. مقایسه و ترسیم درخت فیلوژنتیک توالی COI با سایر گونه‌های گل‌خورک‌ماهیان، این گونه‌ها را در شاخه‌های هم‌جنس خود قرار می‌دهد. به طور کلی، نتایج مولکولی، وجود سه گونه از ماهیان گل‌خورک را در سواحل استان بوشهر تأیید می‌کند. همچنین، داده‌های مولکولی و فیلوژنتیک منطبق بر رده‌بندی مورفولوژیک این گونه‌ها است.

واژه‌های کلیدی: توالی‌یابی، سیتوکروم اکسیداز، خلیج فارس، بارکدینگ، گل‌خورک‌ماهیان

مقدمه

خانواده گاوماهیان متعلق به زیرراسته Gobioides شامل ۹ خانواده با حدود ۲۶۸ جنس و تقریباً ۲۱۲۱ است (Nelson, 1994). این خانواده شامل ماهی‌های کوچک

* aqasemi@gmail.com
Copyright©2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

با ۴ تا ۱۰ سانتی‌متر طول، باله پشتی خاردار جداگانه و باله‌های سینه‌ای که به یک دیسک پیوسته تبدیل شده است، هستند. اغلب ساکن آب‌های شور و از نظر موفولوژی، رفتاری و اکولوژی تنوع بالایی دارند. اغلب گونه‌ها شکارچی هستند و با زندگی در آب‌های ساحلی و کم عمق اقیانوس‌ها و دریاها و دریاچه‌ها سازگاری یافته‌اند (Thacker, 2011). این راسته شامل ۲۲ زیرراسته است که ۴۵ درصد گونه‌ها متعلق به زیرراسته Percoidei است، ۵۰ درصد این راسته در پنج خانواده: Blennidae، Cichlidae، Gobiidae، Labridae و Serranidae جای دارند (Murdy, 1989). زیرخانواده Oxudercinae با ۱۰ جنس و ۳۹ گونه در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری در سواحل جزر و مدی با بستری نرم در آفریقای غربی و نواحی اقیانوس هند-آرام (Indo-pacific) پراکنده و به گل‌خورک ماهیان معروف هستند (Agorreta *et al.*, 2013). شش گونه: *Boleophthalmus dussumieri*، *Periophthalmus argentlineatus*، *P. waltoni*، *Scartelaos histophorus* و *Scartelaos tenuis* از گل‌خورک‌ها از خلیج فارس تا بمبئی هند پراکنش دارند، از این تعداد، سه گونه *B. dussumeri*، *P. waltoni* و *S. teneus* بومی منطقه و در خلیج فارس یافت می‌شوند (Murdy, 1989). گونه *P. waltoni* گونه غالب گل‌خورک‌ها در خلیج فارس و دریای عمان است.

از سه گونه گل‌خورک موجود در خلیج فارس، گونه گل‌خورک *P. waltoni* بومی خلیج فارس و دریای عمان است و تنها در سواحل خلیج فارس تا دریای عمان پراکنش دارد. پراکنش آن در آب‌های ایران از اروندرود در حوضه آبریز رودخانه دجله، بخش پایینی رودخانه زهره، بخش‌های پایینی رودخانه‌های حله و مند در حوضه آبریز خلیج فارس، رودخانه‌های کل و مهران در حوضه آبریز هرمزگان، انشعابات پایینی رودخانه مکران از جگین تا باهوکلات است (Abdoli, 2000). گونه‌های گل‌خورک در ایران از نظر اقتصادی اهمیت ندارند، اما به عنوان غذای پرندگان، ماهیان و از نظر اکولوژی در جنگل‌های حرا مهم هستند.

در سال‌های اخیر، از گاوماهیان به طور گسترده، به عنوان مدل آزمایشگاهی در مطالعات تطابق در شرایط یوری هالین و یوریترمال، اکوفیزیولوژی، تغییرات مورفولوژیک برای سازش در شرایط خشکی، نقش انتخاب جفت در تکامل و مراقبت‌های والدینی، شاخص زیستی و نشانگر زیستی جهت سنجش شرایط زیستی در سواحل گلی و مانگرو استفاده شده است. با وجود اهمیت تکاملی و اکولوژیک زیرراسته Gobioides، روابط فیلوژنی درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای آنها بر پایه ویژگی‌های مورفولوژی و مولکولی هنوز به طور کامل و دقیق شناخته نشده است (Thacker, 2011).

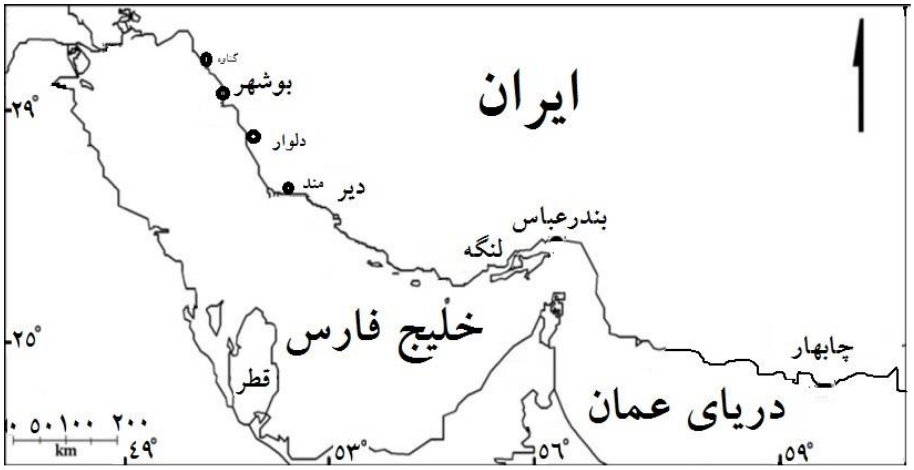
بارکدینگ DNA یک روش مولکولی برای تشخیص در سطح گونه یوکاریوت‌ها بر پایه آنالیز توالی کوتاه و استانداردی از ژن است (Hebert *et al.*, 2003a). در اغلب جانوران، از ناحیه ۵ سیتوکروم اکسیداز C زیرواحد COI در ژنوم میتوکندریایی به عنوان ژن هدف استفاده می‌شود (Hebert *et al.*, 2003b؛ Ward *et al.*, 2005). بارکدینگ یک روش سریع و مطمئن برای تشخیص در سطح گونه و تعیین تاکسون‌ها در رده‌بندی است و نگرش جدیدی در اکولوژی، تنوع زیستی و تاکسونومی ماهیان در مناطق مختلف جغرافیایی ارایه کرده است. به تازگی، تمایل به استفاده از DNA بارکدینگ برای شناسایی گونه و ارزیابی تنوع زیستی افزایش یافته است. از مهم‌ترین

مزیت‌های بارکدینگ این است که می‌تواند با استفاده از کل ماهی، فیله ماهی، باله‌ها، لاروها، تخم و هر بافتی که بتوان از آن DNA استخراج کرد، استفاده کرد، همچنین، عدم تأثیرپذیری از محیط، سرعت انجام، هزینه کم، نیاز به آزمایش کم جهت توالی‌یابی و استفاده از یک شاخص در مقابل رده‌بندی چند متغیره از دیگر دلایل تمایل استفاده از این روش است (Dasmahapatra and Mallet, 2006؛ Shearer and Coffroth, 2008). ماهیان دارای گروه‌های متنوعی از نظر مورفولوژی در بین مهره‌داران هستند؛ همچنین، دارای تنوع فنوتیپی متغیر طی مراحل مختلف رشد هستند؛ به همین علت، شناسایی تمام گونه‌های ماهیان از طریق بسنده کردن به صفات مورفولوژیک امکان‌پذیر نیست (Byrkjedal *et al*., 2007). در جهان، مطالعات گسترده‌ای در زمینه بارکدینگ انجام گرفته است. از میان ۳۰۰۰۰ گونه ماهی که تاکنون شناسایی شده است، بیش از ۱۰۰۰۰ گونه بارکدینگ شده است که در FISH-BOL قابل دسترسی است (Ward *et al*., 2009؛ FISH-BOL, 2015).

در مورد ماهیان خلیج فارس تنها یک گزارش بارکدینک وجود دارد (Asgharian *et al*., 2011). تاکنون در ایران مطالعه مولکولی برای شناسایی گاوماهیان و گل‌خورک‌ماهیان گزارش نشده است. در جهان، مطالعات تاکسونومی مولکولی گاوماهیان (Thacker, 2003؛ Ruber and Agorreta, 2011؛ Agorreta *et al*., 2013) و گل‌خورک‌ماهیان (Yang *et al*., 2012) انجام گرفته است. با توجه به اهمیت گل‌خورک‌ها از نظر اکولوژی و مطالعات توکسیکولوژی و نشانگرهای زیستی، تحقیق حاضر با هدف شناسایی مولکولی و تأیید دقیق گونه‌های گل‌خورک‌ماهیان در خلیج فارس انجام گرفت.

روش تحقیق

پژوهش حاضر در سواحل جنوبی ایران در خلیج فارس و استان بوشهر انجام گرفت. نمونه‌های گل‌خورک از گناوه (N "44.77 '30 °29؛ '35 °50 E "49.92)، جزیره شیف در بوشهر (N "44.82 '57 °28؛ E "20.70 '46 °50)، دلوار (N "28.63 '47 °28؛ E "28.75 °51) و مند (N "35.79 '48 °28؛ '15 °51 E "55.59) جمع‌آوری گردید (شکل ۱). از هر منطقه، ۲۰ نمونه ماهی گل‌خورک صید و در الکل تثبیت شد. شناسایی ماهیان با کلید شناسایی (Murdy, 1989) انجام شد، از هر منطقه، سه نمونه از هر یک از گونه‌ها *B. dussumeri*، *P. waltoni* و *S. teneus* جهت بارکدینگ انتخاب گردید. استخراج DNA با استفاده از روش CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) انجام گرفت (Jaferian et al., 2010)، ۵۰ میلی‌گرم از بافت ماهیچه در ۶۳۰ میکرولیتر از محلول ۱ درصد CTAB به همراه ۴ میکرولیتر از پروتئیناز K به مدت ۵ ساعت در دمای ۵۵ درجه هضم گردید. پس از هضم بافت، ۲۵۰ میکرولیتر NaCl ۵ مولار و ۲ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول به محلول اضافه، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس، ۲۵۲ میکرولیتر کلروفرم به هر نمونه افزوده و پس از شیک کوتاه مدت و آرام به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی g ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی به تیوب‌های جدید منتقل و به هر نمونه ۷۰۰ میکرولیتر اتانول سرد افزوده شد و پس از سر و ته کردن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از رسوب دادن DNA، محلول رویی خارج و رسوب حاصل یک مرتبه با اتانول ۷۰ درصد، شستشو داده شد. در پایان، به هر نمونه ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده شد (Jaferian *et al*., 2010).



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی مکان‌های نمونه‌برداری از ماهیان گل‌خورک در استان بوشهر

تکثیر، خالص‌سازی و تعیین توالی قطعات DNA: برای تکثیر ناحیه ۵ از ژن سیتوکروم اکسیداز C از یک جفت پرایمر جهانی (پرایمر FishF1-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC و FishR1-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGA) که عمدتاً برای بارکدینگ ماهیان استفاده می‌شود به‌کار گرفته شد (Ward *et al*., 2005). واکنش زنجیره‌های پلیمراز در حجم ۵۰ میکرولیتر برای هر نمونه با ۵ میکرولیتر بافر PCR (سیناژن)، ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرومولار از dNTPs، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (با غلظت ۱۰ پیکومول) و ۲/۵ واحد از SmatTaq و ۱۰۰ نانوگرم DNA ماهی گل‌خورک انجام گرفت (شرکت سیناژن). چرخه‌های PCR شامل: ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به عنوان آغاز واکنش، ۱۰ چرخه کاهش دمایی شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۴ درجه سانتیگراد، یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و ۲۰ چرخه استاندارد شامل: ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۴ درجه سانتیگراد، یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد ودر پایان واکنش یک مرحله طویل‌سازی به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول به دست آمده روی ژل آگاروز ۱ درصد به منظور صحت انجام واکنش وکیفیت محصول بررسی شد. محصول با استفاده از کیت (PCR Clean-up Kit, Cinaclon) خالص‌سازی و نمونه‌ها توسط شرکت فزاپژوه توالی‌یابی شد.

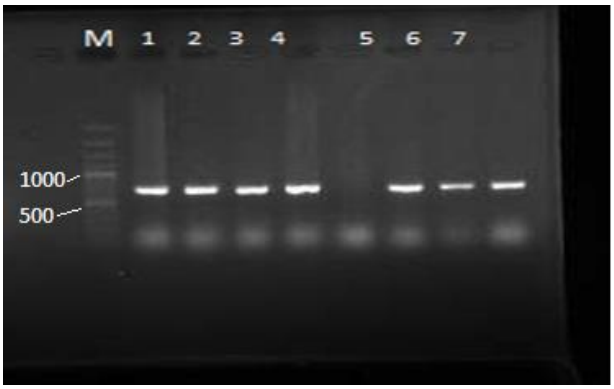
تعیین توالی و بررسی نرم‌افزاری: از هر یک از گونه‌های *B. dussumeri*، *P. waltoni* و *S. teneus*، هشت نمونه از مناطق: گناوه، شیف، دلوار و دیر توالی‌یابی شد. با استفاده از نرم‌افزار BioEite4.0 نسخه ۴/۰ توالی‌ها بررسی و صحت آنها با استفاده از کروماتوگرام مربوطه بررسی شد. توالی‌های به دست آمده با استفاده از nBlast و Blastx با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن مقایسه گردید. به منظور شناسایی اختلاف میان توالی‌ها، نمونه‌های توالی‌یابی شده با نرم‌افزار Clustal W2 (Thompson *et al*., 2002) و بازنگری توالی‌های مشابه با نرم‌افزار Bioedit ردیف شدند. ترکیب باز و نسبت جانشینی ترانزیشن و

ترانسفورژن در نرم‌افزار DnaSp محاسبه شد (Rozas *et al.*, 2003). توالی CoxI تعدادی از گونه‌های گل‌خورک از بانک جهانی ژن استخراج گردید |AF391339.1| *Periophthalmus barbarous*، |JX679027.1| *Boleophthalmus pectinirostris*، |KP277118.1| *Boleophthalmus* sp.، |KF874277.1| *Boleophthalmus boddarti*، |JN631352.1| *Boleophthalmus pectinirostris*، |AF391339.1| *Periophthalmus barbarous*، |KM229327.1| *Periophthalmus novemradiatus*، |FJ238025.1| *Scartelaos histophorus*، |JX679049.1| *Periophthalmus magnuspinnatus* و |AF391339.1| *Periophthalmus barbarous*.

فاصله ژنتیکی با روش Kimura 2-parameter (K2p) و حذف کامل Gap، در نظر گرفتن جهش‌های ترانزیشن و ترانسفورژن، سرعت جانشینی یکنواخت و الگوی هموژن بین افراد در نرم‌افزار MEGA نسخه ۶/۰ محاسبه شد. درخت فیلوژنی بر اساس دو روش Neighbor-Joining و UPGM با استفاده از فاصله ژنتیکی K2p با پشتوانه تکرار ۱۰۰۰ بار، حذف کامل Gap، در نظر گرفتن جهش‌های ترانزیشن و ترانسفورژن، سرعت جانشینی یکنواخت و الگوی هموژن بین افراد در نرم‌افزار MEGA نسخه ۶/۰ ترسیم گردید (Tamura *et al.*, 2013).

نتایج

نتایج الکتروفورز نشان داد که با استفاده از آغازگرهای FishR1 و FishF1 قطعه ۶۰۰ نوکلئوتیدی در سه گونه *B. dussumeri*، *P. waltoni* و *S. teneus* تکثیر می‌گردد (شکل ۲). نتایج توالی‌یابی ۶۰۰ نوکلئوتید از ناحیه سیتوکروم اکسیداز C را فراهم کرد، بلاست این توالی‌ها در بانک جهانی (NCBI) نشان می‌دهد که این توالی قسمتی از ناحیه ۵ ژن سیتوکروم اکسیداز C میتوکندریایی در ماهیان است ($P<0.01$). پس از هم‌ردیفی توالی‌های به دست آمده، توالی ژن سیتوکروم اکسیداز C سه گونه در بانک جهانی ژن ثبت شد. برای گونه *P. waltoni* دو هاپلوتیپ با نام‌های HaPV1 و HaPV2 و برای گونه‌های *B. dussumeri* و *S. teneus* هر کدام یک هاپلوتیپ به ترتیب با نام‌های HBD1 و HaSt در NCBI قابل دسترسی است. ترکیب بازی در گونه *P. waltoni* غنی از AT (۵۴/۲ درصد)، گونه *B. dussumeri* غنی از AT (۵۴/۵ درصد) گونه *S. teneus* غنی از AT (۵۴/۳ درصد) بود. از نظر ترکیب بازی، اختلاف معنی‌داری بین گونه‌های گل‌خورک مورد مطالعه مشاهده نشد ($P<0.01$).



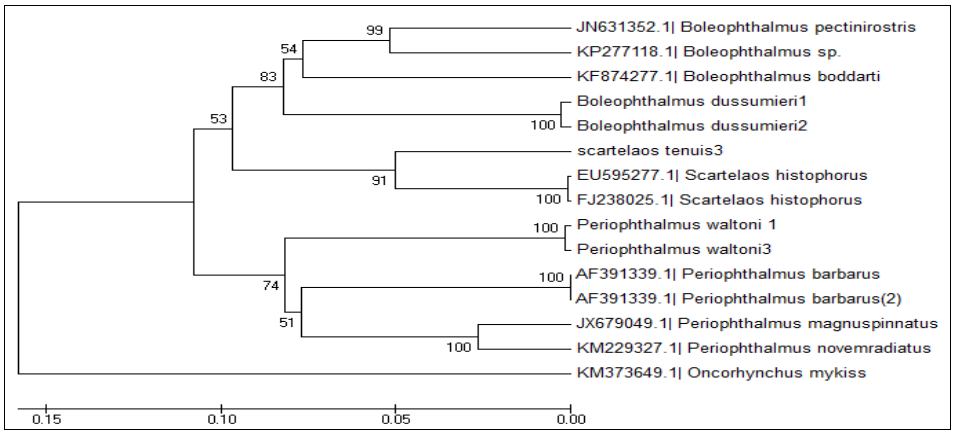
شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن سیتوکروم اکسیداز C روی ژل آگاروز یک درصد (M: نشانگر و 1-7: محصول PCR)

فاصله ژنتیک بین ده گونه گل‌خورک با استفاده از K2p محاسبه شد (جدول ۱). میزان فاصله ژنتیک از ۵/۱ تا ۲۴/۵ درصد متغیر بود. کمترین فاصله ژنتیک به میزان ۵/۱ بین دو گونه *Periophthalmus novemradiatus* و *Periophthalmus magnuspinnatus* درصد و بیشترین فاصله ژنتیکی به میزان ۲۴/۵ درصد بین دو گونه *Boleophthalmus dussumieri* و *Periophthalmus novemradiatus* به دست آمد. در میان گونه‌های مطالعه شده، بیشترین فاصله ژنتیکی بین دو گونه *Periophthalmus waltoni* و *Boleophthalmus dussumier* به میزان ۱۹/۴ درصد و کمترین فاصله ژنتیکی به میزان ۱۱/۹ درصد بین دو گونه *Scartelaos tenuis* و *Periophthalmus waltoni* برآورد شد. میزان تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای از ۰ تا ۰/۳، بین گونه‌های یک جنس ۸/۱ تا ۱۶/۶ با میانگین ۱۳/۲ و بین جنس‌ها از ۱۱/۹ تا ۲۴/۵ با میانگین ۱۷/۸ محاسبه گردید.

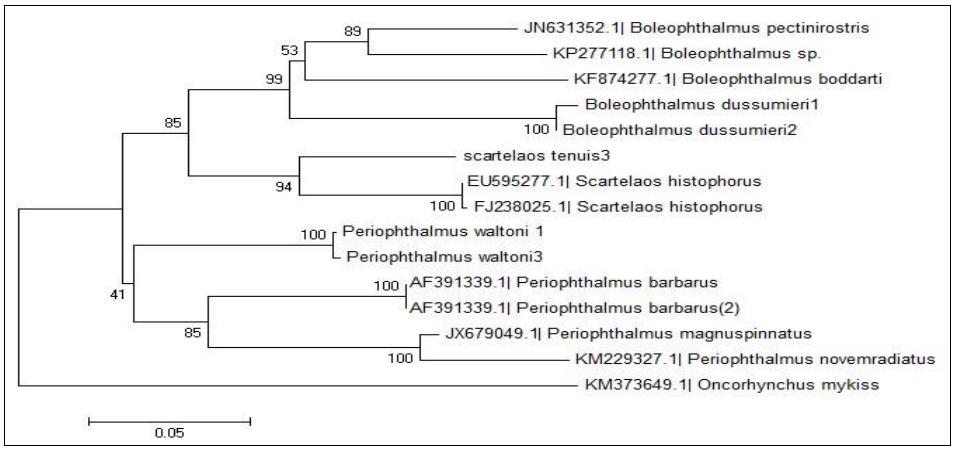
درخت فیلوژنی ترسیم شده با هر دو روش Neighbor-Joining و UPGM یکسان بود. در هر دو روش، گونه‌های مطالعه شده در شاخه‌های خواهری نسبت به هم‌جنس خود قرار گرفتند. جنس‌های *Boleophthalmus* و *Scartelaos* در یک شاخه و جنس *Periophthalmus* در شاخه‌ای کاملاً مجزا قرار گرفت. در این شاخه، گونه *P. waltoni* به صورت جداگانه از سایر گونه‌های جنس *Periophthalmus* در یک زیرشاخه قرار گرفت.

جدول ۱- اختلاف ژنتیکی محاسبه شده بر اساس روش K2p بین گونه‌های ماهیان گل‌خورک

Taxon		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	*Periophthalmus barbarus*									
2	*Periophthalmus magnuspinnatus*	0.120								
3	*Scartelaos tenuis*	0.178	0.180							
4	*Scartelaos histophorus*	0.178	0.186	0.083						
5	*Periophthalmus novemradiatus*	0.157	0.051	0.212	0.211					
6	*Boleophthalmus pectinirostris*	0.186	0.192	0.161	0.139	0.230				
7	*Boleophthalmus* sp.	0.175	0.189	0.171	0.152	0.229	0.102			
8	*Boleophthalmus boddarti*	0.202	0.190	0.176	0.167	0.215	0.138	0.141		
9	*Boleophthalmus dussumieri*	0.181	0.211	0.183	0.157	0.245	0.140	0.143	0.156	
10	*Periophthalmus waltoni*	0.146	0.137	0.119	0.176	0.166	0.172	0.189	0.171	0.194



شکل ۳- درخت Neighbor-Joining ترسیم شده بر اساس فاصله ژنتیکی K2p ژن COI گونه‌های ماهی گل‌خورک



شکل۴- دندروگرام UPGM ترسیم شده بر اساس فاصله ژنتیکی K2p ژن COI گونه‌های ماهی گل‌خورک

بحث و نتیجه‌گیری

تعیین حدود و شناخت گونه‌های ماهیان نه تنها برای علوم رده‌بندی و سیستماتیک استفاده می‌شود، بلکه در مطالعات تاریخ طبیعی ومحیط زیست، مدیریت شیلات، ردیابی الگوهای پراکندگی تخم و لارو، برآورد ذخایر و مناطق تخم‌ریزی، وتصدیق هویت محصولات غذایی مورد نیاز است (Rasmussen *et al*., 2009). ماهیان با داشتن تقریباً ۳۱۸۰۰ گونه، بیش از ۵۰ درصد از گونه‌های مهره‌داران را شامل می‌شوند، اما هنوز هم در مورد تاکسونومی بسیاری از گونه‌ها جای بحث وجود دارد (John *et al*., 2010). گل‌خورک‌ماهیان از ماهیان قدیمی و حدواسط روند تکاملی هستند که به دلیل غیراقتصادی بودن در خلیج فارس کمتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. اما اخیراً به دلیل مطالعات سم‌شناسی و نشانگرهای زیستی، مطالعات اکوفیزیولوژی و نحوه سازش مورد توجه قرار گرفته‌اند (Ansari *et al*., 2014).

مطالعات مورفولوژیک در مورد گونه‌های گل‌خورک خلیج فارس وجود سه گونه را تأیید می‌کند (Abdoli, 2000). در پژوهش حاضر، بر اساس داده‌های مورفولوژیک، دو گونه *B. dussumeri* و *P. waltoni* در مناطق شیف و گناوه و سه گونه *B. dussumeri*، *P. waltoni* و *S. teneus* در منطقه دلوار و دیر شناسایی شد. بیشترین فراوانی در همه مناطق مربوط به گونه *P. waltoni* و سپس *B. dussumeri* بود.

توالی‌های سیتوکروم اکسیداز سه گونه *P. waltoni* (LC060484, LC060485) و *S. teneus* (LC060486) و *B. dussumeri* (LC060487) در بانک جهانی ثبت شد. از هر گونه، ۸ نمونه توالی‌یابی گردید که در گونه‌های *B. dussumeri* و *P. waltoni*، دو هاپلوتیپ و در گونه *S. teneus* یک هاپلوتیپ مشاهده شد. میزان تنوع درون‌گونه‌ای به دست آمده به میزان ۰ تا ۰/۳ درصد بود که در مقایسه با گونه‌های ماهیان دریایی، حد متوسطی از تنوع به شمار می‌رود. به طور کلی، میزان تنوع در ناحیه سیتوکروم اکسیداز بسیار پایین است. حداکثر میزان تنوع درون‌گونه‌ای در ماهیان، یک درصد است و تقریباً در اغلب گونه‌های ماهیان، میزان تنوع درون‌گونه‌ای کمتر از ۱ درصد است. با این حال، تنوع ۷ درصد در ماهیان آب شیرین (Hubert *et al*., 2008) و ۲۲/۱۶ درصد در ماهیان مناطق مرجانی (Hubert *et al*.,

(2012 گزارش شده است. با توجه به تعداد نمونه (۸ نمونه از هر گونه) انتظار وجود تنوع بیشتری می‌رفت. بیشترین تنوع در گونه *P. waltoni* است که به علت فراوانی بیشتر آن است، در حالی که در گونه *S. teneus* به علت فراوانی کم در محیط، هیچ تنوعی در آن مشاهده نگردید. مقایسه فراوانی هاپلوتیپ‌ها در مناطق مختلف جمعیت خاصی را نشان نداد ($P>0.05$). اصولاً جمعیت‌های ماهیان دریایی بیشتر از نوع جمعیت‌های جغرافیایی هستند (Hubert *et al*., 2012) و با توجه به فاصله جغرافیایی مناطق نمونه‌گیری (بیشتر از ۱۰۰ کیلومتر) انتظار نمی‌رود جمعیت‌های متفاوتی از ماهیان گل‌خورک وجود داشته باشد. مطالعه Bachari و همکاران (۲۰۱۲) جمعیت‌های متمایزی از *P. waltoni* را درخلیج فارس نشان داد، بر مبنای نتایج مطالعه حاضر می‌توان بیان نمود که تمایز جمعیت‌ها در مناطق نمونه‌برداری گونه *P. waltoni* در سطحی نیست که در تنوع ژن COI مشاهده شود.

در ماهیان گل‌خورک میزان فاصله ژنتیکی درون‌گونه‌ای از ۰ تا ۰/۳، بین‌گونه‌های یک جنس ۸/۱ تا ۱۶/۶ با میانگین ۱۳/۲ و بین جنس‌ها از ۱۱/۹ تا ۲۴/۵ با میانگین ۱۷/۸ درصد برآورد شد. میزان اختلاف ژنتیکی بین‌گونه‌ای و بین جنس‌ها در مطالعه حاضر، بالایی بود. این حد از اختلاف ژنتیکی در مطالعات گذشته نیز گزارش شده است. در ماهیان جزایر مرجانی، اختلاف ژنتیکی بین‌گونه‌ای و بین‌جنس‌ها به ترتیب ۲۵/۳۴ و ۲۰/۵۵ درصد (Hubert *et al*., 2012) و در میان پنج جنس گربه ماهیان ۱۸/۳ درصد گزارش شده است (Wong *et al*., 2011). میزان اختلاف ژنتیکی بین‌گونه‌ای و بین‌جنس‌های ماهیان آب‌های شیرین کانادا به ترتیب ۸/۲۷ و ۱۵/۳۸ درصد (Hubert *et al*., 2008)، در ماهیان دریایی استرالیا میزان اختلاف ژنتیکی بین‌جنس‌ها ۹/۹۳ درصد (Ward *et al*., 2005)، در کوسه‌ها و ماهیان غضروفی ۷/۴۸ درصد (Ward *et al*., 2008) و در ماهیان آب‌های آرژانتین اختلاف ژنتیکی درون‌جنس‌ها ۴/۴ درصد و بین‌جنس‌ها ۱۶/۳ درصد (Mabragan *et al*., 2011) گزارش شده است. در برخی از گونه‌ها، اختلاف ژنتیکی بسیار پایین‌تری وجود دارد. البته حد اختلاف ژنتیکی گونه‌ها در اغلب مطالعات برابر با ۳/۵ درصد بوده است. میزان اختلاف ژنتیک به دست آمده در ماهیان گل‌خورک خلیج فارس، تعیین‌کننده گونه است و از حداقل میزان اختلاف ژنتیکی پیشنهادی (۳/۵) بین‌گونه‌ها (Hebert *et al*., 2004) بسیار بیشتر است. در گونه‌های *B. dussumeri* و *P. waltoni* میزان اختلاف ژنتیکی بالایی (۱۹/۴ درصد) مشاهده شد، بین دو گونه *P. waltoni* و *S. teneus* میزان اختلاف ژنتیکی ۱۱/۹ درصد و در دو گونه *B. dussumeri* و *S. teneus* ۱۸/۳ درصد بود که از حد اختلاف ژنتیکی بین‌گونه‌ای (۳ درصد) بالاتر بود. میزان اختلاف ژنتیکی حداقل ۲۰ برابر میزان تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌های بود، این نسبت در ماهیان دریایی استرالیا ۲۵ برابر (Ward *et al*., 2005) و در ماهیان آب شیرین کانادا ۲۷ برابر است (Hubert *et al*., 2008). این نسبت باید حداقل ۱۰ برابر باشد (Hebert *et al*., 2004).

درخت ترسیم شده بر اساس روش‌های Neighbor-Joining و UPGMA نشان داد که گونه‌های هم‌جنس در یک شاخه قرار می‌گیرند. بر اساس شاخه مورفولوژیک، گل‌خورک‌ها به دو دسته تقسیم می‌شوند: در شاخه Oxudercini جنس‌های *Boleophthalmus* و *Scartelaos* و در شاخه Periophthamini جنس *Periophthalmus* به طور

جداگانه قرار می‌گیرند (Murdy, 1989؛ Rüber and Agorreta, 2011)؛ اما بر اساس داده‌های مولکولی، جنس‌های *Boleophthalmus* و *Scartelaos* در یک شاخه و جنس *Periophthalmus* در شاخه جدا قرار دارد. نتایج بررسی حاضر با نتایج Yang و همکاران (۲۰۱۲) و You و همکاران (۲۰۱۴) همخوانی دارد. به طور کلی، جنس‌های *Boleophthalmus* و *Scartelaos* قرابت بیشتری با هم دارند؛ با وجود این قرابت زیاد، باز هم این دو گونه در دو شاخه جداگانه هستند؛ زیرا تفاوت جنس‌های *Boleophthalmus* و *Scartelaos* بسیار بیشتر از شباهت گونه‌های *B. dussumeri* و *S. teneus* است. این میزان شباهت بین دو گونه جای بحث دارد که نیاز به استفاده از ژن‌های هسته‌ای برای تأیید آن است.

با توجه به میزان اختلاف ژنتیکی به دست آمده و در مقایسه هر گونه از گل‌خورک‌ماهیان با هم‌جنس‌های خود، بر اساس داده‌های بارکدینگ، گونه‌های مورد نظر همان گونه‌هایی هستند که از نظر مورفولوژی شناسایی شده‌اند. انتظار می‌رود که گونه‌های *B. dussumeri* و *P. waltoni* با هم قرابت بیشتری داشته باشند، زیرا از نظر مورفولوژی بسیار شبیه هستند، اگر چه از نظر اندازه با هم متفاوت هستند، اما از نظر فیزیولوژی و اکولوژی شباهت بالایی با هم دارند. در مقابل، گونه *S. teneus* بسیار وابسته به آب و با اکولوژی متفاوت‌تر است، در حالی که *P. waltoni* خشکی‌زی‌ترین گونه گل‌خورک است. به نظر می‌رسد که شرایط محیطی و اکولوژی با توجه به محل زندگی متغیر این گونه‌ها، تأثیر بسیاری بر مورفولوژی این گونه‌ها داشته باشد. با توجه به اطلاعات موجود، گونه‌زایی گل‌خورک‌ها مشخص نیست، اما گونه‌زایی *P. waltoni* در دریای عمان و خلیج فارس رخ داده است. به طور کلی، نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که سه گونه از گل‌خورک‌ماهیان در سواحل استان بوشهر وجود دارد. داده‌های ژنتیکی، رده‌بندی مورفولوژیک گل‌خورک‌ماهیان را تأیید می‌کند.

سپاسگزاری

نگارندگان از کارشناسان آزمایشگاه ژنتیک و ریاست پژوهشکده خلیج فارس به خاطر تأمین تجهیزات آزمایشگاهی و از آقایان مهندس فقیه و فخری به خاطر همکاری در تهیه نمونه تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

Abdoli, A. (2000) The inland water fishes of Iran. Iranian Museum of Nature and Wildlife, Tehran (in Persian).

Agorreta, A., San Mauro, D., Schliewen, U., Van Tassell, J. L., Kovačić, M., Zardoya, R. and Rüber, L. (2013) Molecular phylogenetic of Gobioidei and phylogenetic placement of European gobies. Molecular Phylogenetics and Evolution 69(3): 619-633.

Ansari, A. A., Trivedi, S., Saggu, S. and Rehman, H. (2014) Mudskipper: A biological indicator for environmental monitoring and assessment of coastal waters. Journal of Entomology and Zoology Studies 2(6):22-33

Asgharian, H., Sahafi, H. H., Ardalan, A. A., Shekarriz, S. and Elahi, E. (2011) Cytochrome C oxidase subunit 1 barcode data of fish of the Nayband National Park in the Persian Gulf and analysis using meta-data flag several cryptic species. Molecular Ecology Resources 11: 461-472.

Bachari, S., Zolgharnin, H., Mohamadi, M., Salari, M. and Ghasemi, A. (2012) Study of genetic

diversity of mudskipper (*Periophthalmus waltoni*) using RAPD markers in the Persian Gulf. Journal of Marine Science and Technology 11(3):62-70

Byrkjedal, I., Rees, D. J. and Willassen, E. (2007) Molecular and morphological insights into the taxonomic status of *Eumicrotremus spinosus* (Fabricius, 1776) and *Eumicrotremus eggvinii* Koefoed, 1956 (Teleostei: Cyclopteridae). Journal of Fish Biology 71: 111-131.

Dasmahapatra, K. K. and Mallet, J. (2006) DNA barcodes: recent successes and future prospects. Heredity 97: 254-255.

FISH-BOL (2010) Fish barcode of life initiative campaign. Retrieved from http://www.fishbol.org. On 11 September 2015.

Hebert, P. D., Cywinska, A. and Ball, S. L. (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 270(1512): 313-321.

Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. and Hallwachs, W. (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly Astraptes fulgerator. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(41): 14812-14817.

Hebert, P. D., Ratnasingham, S. and de Waard, J. R. (2003b) Barcoding animal life: cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 270(Suppl 1): S96-S99.

Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N. E., Taylor, E., Burridge, M. and Zhang, J. (2008) Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. PLoS One 3: e2490.

Hubert, N., Meyer, C. P., Bruggemann, H. J., Guerin, F., Komeno, R. J., Espiau, B. and Planes, S. (2012) Cryptic diversity in Indo-Pacific coral-reef fishes revealed by DNA-barcoding provides new support to the centre-of-overlap hypothesis. PLoS One 7(3): e28987.

Jaferian, A., Mehdi, M., Qasemi, A. and Hossini, S. J. (2010) A simple and efficient novel method for DNA extraction from *Eleutheronema tetradactylum* (Shaw, 1804). World Journal of Fish and Marine Science 2(5): 68-73.

John, A., Prasannakuma, C., Lyla, P. S., Khan, S, A. and Jalal, K. C. A. (2010) DNA barcoding of *Lates calcarifer* (Bloch, 1970). Research Journal of Biological Sciences 5: 414-419.

Mabragan, E., Dı´az de Astarloa, J. M., Hanner, R., Zhang, J. and Gonza ´lez Castro, M. (2011) DNA barcoding identifies Argentine fishes from marine and brackish waters. PLoS One 6(12): e28655.

Murdy, E. O. (1989) A taxonomic revision and cladistics analysis of the Oxudercinae gobies (Gobiidae: Oxudercinae). Research Australia Museum Supply 11: 1-93.

Rasmussen, R. S., Morrissey, M. T. and Hebert, P. D. N. (2009) DNA barcoding of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus*and *salmo*) from North America. Journal of Agriculture and Food Chemistry 57: 8379-8385.

Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. and Rozas, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19(18): 2496-2497.

Rüber, L. and Agorreta, A. (2011) Molecular systematics of gobioid fishes. In: Biology of Gobies (Eds. Patzner, R. A., Van Tassell, J. L., Kovacic, M. and Kapoor, B. G.) 23-50. Science Publishers, Inc., Enfield.

Seberg, O., Humphries, C. J., Knapp, S., Stevenson, D. W., Petersen, G., Scharff, N. and Andersen, N. M. (2003) Shortcuts in systematics? A commentary on DNA-based taxonomy. Trends in Ecology and Evolution 18(2): 63-65.

Shearer, T. L. and Coffroth, M. A. (2008) DNA Barcoding: Barcoding corals: limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. Molecular Ecology Resources 8(2): 247-255.

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(12): 2725-2729.

Thacker, C. E. (2003) Molecular phylogeny of the gobioid fishes. Molecular Phylogenetics and Evolution 26(3): 354-368.

Thacker, C. E. (2011) Systematics of gobiidae. In: Biology of Gobies (Eds. Patzner, R. A., Van Tassell, J. L., Kovacic, M. and Kapoor, B. G.) 129-136. Science Publishers, Inc., Enfield.

Thompson, J. D., Gibson, T. and Higgins, D. G. (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. Current Protocols in Bioinformatics DOI: 10.1002/0471250953.bi0203s00.

Ward, R. D., Hanner, R. and Hebert, P. D. (2009) The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. Journal of Fish Biology 74(2): 329-356.

Ward, R. D., Holmes, B. H., White, W. T. and Last, P. R. (2008) DNA barcoding Australaian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. Marine and Fresh Water Research 59(1): 57-71.

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. and Hebert, P. D. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 360(1462): 1847-1857.

Wong, L. L., Peatman, E., Lu, J., Kucuktas, H., He, S., Zhou, C. and Liu, Z. (2011) DNA barcoding of catfish: species authentication and phylogenetic assessment. PLoS One 6(3): e17812.

Yang, F., He, L. J., Lei, G. C. and Zhang, A. B. (2012) Genetic diversity and DNA barcoding of mudskipper common species along southeast coasts of china. Chinese Journal Ecology 31: 676-683.

You, X., Bian, C., Zan, Q., Xu, X., Liu, X., Chen, J., Wang, J., Qiu, Y., Li, W., Zhang, X., Sun, Y., Chen, S., Hong, W., Li, Y., Cheng, S., Fan, G., Shi, C., Liang, J., Tom Tang, Y., Yang, C., Ruan, Z., Bai, J., Peng, C., Mu, Q., Lu, J., Fan, M., Yang, S., Huang, Z., Jiang, X., Fang, X., Zhang, G., Zhang, Y., Polgar, G., Yu, H., Li, J., Liu, Z., Zhang, G., Ravi, V., Coon, SL., Wang, J., Yang, H., Venkatesh, B., Wang, J. and Shi, Q. (2014) Mudskipper genomes provide insights into the terrestrial adaptation of amphibious fishes. Nature Communications 5.

DNA barcoding of mudskippers (*Boleophthalmus dussumeri*, *Periophthalmus waltoni* and *Scartelaos teneus*) from Bushehr coastal waters

Seyed Ahmad Ghasemi [1]*, Abdolali Movahedinia [1], Negin Salamat [1] and Bahram Kazemi [2]
[1] Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran
[2] Department of Parasitology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract
Mudskippers are important in many biological and ecotoxicological studies and recognized as potentioal Biomarker in environmental monitoring and assessments of coastal waters in tropical and subtropical ecosystems. DNA Barcoding technique was used to identify the exact species of mudskippers in the Persian Gulf from Coastal waters of Bushehr province. This technique may provide faster detecting and giving a lot of information about the taxonomy of species. Samples were collected from four areas including Genaveh, Shif, Delawar and Mond in Bushehr province. According to morphological properties three species (*Boleophthalmus dussumeri*, *Periophthalmus waltoni* and *Scartelaos teneus*) were identified. In order to barcoding, mitochondrial cytochrome C oxidase of the fish was sequenced. COI sequence analysis of ten specimens from each species indicates that *B. dussumeri*, *P. waltoni* and *S. teneus* have genetic differences in amount of 17.8%. Maximum genetic differences were calculated between *B. dussumeri*, *P. waltoni* (19.1%) and minimum genetic differences were observed between *P. waltoni* and *S. teneus* (11.8%). These amounts of genetic differences among the studied mudskippers, approve the presence of three species in Bushehr coastal waters. COI sequence comparison and phylogenetic tree of each studied species with other mudskippers clustered these species in the same genus. In molecular obtained data confirmed the present morphological classification methods for these species.
Key words: Sequencing, Cytochrom oxidase, Persian Gulf, Barcoding, *Boleophthalmus dussumeri*, *Periophthalmus waltoni*, *Scartelaos teneus*

* aqasemi@gmail.com

Copyright©2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.