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

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان :

تعیین توالی نوکلئوتیدهای بخشی از ژنوم میتوکندریال(CO1) شش تا هشت گونه میگوی تجاری خلیج فارس و دریای عمان به عنوان خط شناسه گونه های ایران به روش مولکولی (PCR-Sequencing)

مجری:
سهراب رضوانی گیل کلائی

شماره ثبت
٤٧٦٦٤

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان پروژه : تعیین توالی نوکلئوتیدهای بخشی از ژنوم میتوکندریال(CO1) شش تا هشت گونه میگوی تجاری خلیج فارس و دریای عمان به عنوان خط شناسه گونه های ایران به روش مولکولی -PCR (Sequencing)

شماره مصوب پروژه : ۹۱۰۰۱- ۹۱۵۳ -۱۲-۱۲-۱٤

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : سهراب رضوانی گیل کلائی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : سهراب رضوانی گیل کلائی

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : احمد غرقی - سعیدتمدنی جهرمی- نصیرنیامیمندی- یزدان مرادی- محبعلی سیستانی- سید پرویز محبی نوذر- غلام اسکندری- ناصرکرمی راد- آذین فهیم- فرامرز لالویی- محمدجواد تقوی- رضا عباسپورنادری- حمزه پورغلام

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -

محل اجرا : استان تهران

تاریخ شروع : ۹۱/۱۰/۱

مدت اجرا : ۱ سال

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار : سال۱۳۹۵

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : تعیین توالی نوکلئوتیدهای بخشی از ژنوم میتوکندریال(CO1) شش تا هشت گونه میگوی تجاری خلیج فارس و دریای عمان به عنوان خط شناسه گونه های ایران به روش مولکولی (PCR-Sequencing)

کد مصوب : ۹۱۰۰۱- ۹۱۵۳ -۱۲-۱۲-۱۴

شماره ثبت (فروست) : ۴۷۶۶۴ تاریخ : ۹۴/۶/۱۱

با مسئولیت اجرایی جناب آقای سهراب رضوانی گیل کلائی‌دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته ژنیتک مولکولی می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تاریخ ۹۴/۲/۱۵ مورد ارزیابی و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ▮ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۱-۱ ژنتیک ۲
۱-۲-انگیزه های رو کردن به تاکسونومی مولکولی ۵
۱-۳-کاربردهای DNA بارکدینگ ۶
۱-۴- دلایل استفاده از ژنوم میتوکندریال ۸
۱-۵- دلایل برگزیدن ژن COI ۱۰
۱-۶- مزایای بارکد گذاری **DNA** در ژن **COX1** نسبت به **۱۶s** و سیتوکروم **b** ۱۰
۱-۷- ژن D-LOOP ۱۱
۱-۸- طبقه بندی میگو ۱۲
۱-۹- اهمیت شیلاتی در جهان و ایران ۱۲
۱-۱۰- انواع گونه های میگو ۱۴
۲-مواد و روشها ۱۸
۲-۱- نمونه برداری ۱۸
۲-۲- استخراج Total DNA با استفاده از فنل – کلروفورم (تاگارت و همکاران۱، ۱۹۹۲) ۱۸
۲-۳- اسپکتروفوتومتری ۱۹
۲-۴- طراحی پرایمر ۱۹
۲-۵- واکنش زنجیرهای پلیمراز(PCR) ۲۰
۲-۶- ارزیابی محصول PCR ۲۲
۲-۷- تعیین توالی (Sequencing) مستقیم محصولات PCR ۲۵
۲-۸- بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز (Penaeus semisulcatus) از دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز I به روش RFLP ۲۵
۳- نتایج ۲۷
۳-۱- آنالیز داده ها و فیلوژنیک ۲۷
۳-۲- رسم درخت‌های فایلوژنی ۲۹
۴- بحث و نتیجه گیری ۳۲
منابع ۳۴
چکیده انگلیسی ۳۷

چکیده

خط شناسه گذاری DNA (DNA barcoding) عبارت است از استفاده از یک توالی کوتاه از یک منطقه استاندارد ژنوم جهت کمک به تشخیص، تمایز گونه‌ها و تخصیص دادن نمونه‌ها به گونه‌های شناخته شده یا جدید. این یک حوضه علمی کاملاً جدید در زمینه مطالعات تاکسونومی، سیستماتیک و تنوع زیستی موجودات مختلف می‌باشد. این علم جدید دارای اهمیت معنی‌داری در طبقه‌بندی سریع، دقیق و مطمئن گونه‌های متنوع موجودات زنده و مهم از نظر اقتصادی، پزشکی و کشاورزی می‌باشد.

در میان تنوع زیستی چشمگیر خلیج فارس و دریای عمان، شناسایی سخت پوستان می‌تواند یکی از اولویت‌های نخست باشد. از سوی دیگر، گشتی در پایگاه داده‌های خط‌شناسه نشان می‌دهد که تاکنون اطلاعاتی کمی از سخت پوستان خلیج فارس و دریای عمان در این پایگاه ثبت شده است.

هدف از انجام این تحقیق جبران کاستی های رده بندی ریخت شناسی و همینطورفراهم آوردن بستری برای برآورد میزان بومی بودن گونه ها در محیط های آبی کشور است با توجه به اینکه کشورهای خاورمیانه فعالیت چندانی در جنبش خط‌شناسه‌گذاری نداشته‌اند، خط‌شناسه‌گذاری میگوهای خلیج فاری و دریای عمان توجیه تاکسونومیک، زیست‌محیطی، اقتصادی و ملی در بر دارد.

در این مطالعه شش گونه میگوی آبهای خلیج فارس و دریای عمان با نام‌های میگوی سفید هندی *Fenoro penaeus indicus* ، میگوی موزی *Fenoro penaeus merguensis* ، میگوی ببری سبز *penaeus semisulcatus* ، میگوی سفید *Metapenaeus affinis*، میگوی ژاپنی *Marsupenaeus japonicas* ، میگوی دم قرمز *Fenoro penaeus penicillatus* می‌باشند از ایستگاه‌های مورد نظر (۲۷۰ نمونه) در دریای عمان و خلیج فارس جمع‌آوری و شناسایی شدند، سپس DNA آنها استخراج شده و بعد از انجام PCR، محصول بدست آمده با پرایمرهای اختصاصی تعیین‌توالی شد. در نهایت داده‌های بدست آمده با نرم‌افزارهای فیلوژنی آنالیز شدند. نتایج بدست آمده از این مطالعه بسیار جالب توجه بوده و علاوه بر تفکیک افراد یک گونه از سایر گونه‌ها میزان قرابت گونه‌ها را مشخص می‌کند. نکته قابل توجه در این مطالعه این است که گونه *penicillatus* که بر اساس صفات مورفولوژیکی در جنس *penaeus* جای گرفته بود قرابت بیشتری با گونه‌های جنس *Marsupenaeus* از خود نشان داده است که این مطلب برای اثبات نیازمند بررسی‌های بیشتر می‌باشد.

۱-مقدمه

۱-۱ - ژنتیک

ژنتیک یکی از شاخه های مهم علم زیست شناسی است که چگونگی وراثت صفات در موجودات زنده را مورد بررسی قرار می دهد. از کاربردهای مختلف علم ژنتیک در تحقیقات شیلات می توان به استفاده از روشهای مولکولی در شناسایی گونه ها و تعیین ارتباط بین گونه ها و همچنین مطالعات سیتوژنتیک آبزیان، بررسی تاکسونومیک گونه های مختلف و برآورد میزان نزدیکی بین گونه ها و تخمین میزان ارتباط تکاملی اشاره کرد (امیری نیا، ۱۳۸۲).

شباهت فنوتیپی افراد هم‌گونه که در تاکسونومی سنتی معیار قرار می‌گیرد، از همین همگنی خزانه‌ی ژنی ناشی می‌شود. می‌توان مطمئن بود که تنوع صفاتی که در کلیدهای شناسایی ریخت‌شناختی مورد استناد قرار می‌گیرند، اساس ژنی دارد- حتی اگر ژن‌های کنترل کننده‌ی این صفات اکنون شناخته شده نباشند. به عبارت دیگر، به ازای هر تنوع فنوتیپی مفید برای تمیز گونه‌ها، تنوع ژنتیکی متناظر وجود دارد، در حالی که عکس آن صادق نیست (انواع جهش‌های خاموش و جهش در بخش‌های غیر کد کننده). از سوی دیگر، دانسته است که صفات فنوتیپی بسیار بیش‌تر از توالی DNA دچار هوموپلازی[1] (هموپلازی : وقتی که در چند جاندار، یک ویژگی حالت آپومورف خود را به صورت جداگانه چند بار نشان دهد، می‌گوئیم این ویژگی حالت هموپلاستیک[2] دارد) می‌شوند. به این دلیل، و به دلیل حجم زیاد و استاندارد بودن اطلاعات توالی، امروزه برای استنباط فیلوژنی از توالی DNA خیلی بیش‌تر از صفات فنوتیپی استفاده می‌شود.

مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت درآبزیان دریایی نه تنها از جنبه بررسی های تاکسونومیک و حفاظت گونه ای مهم و جالب توجه می باشد، بلکه به دلیل اهمیت این موجودات در تامین ذخایر پروتئینی، در مدیریت ذخایر و طراحی برنامه های حفاظت از محیط زیست دریایی بسیار حائز اهمیت است. مطالعه ژنتیک جمعیت مهره‌دارانی همانند ماهی‌ها در محیط‌های دریایی می‌تواند به پایه‌ریزی علمی و صحیح برنامه‌های مدیریتی در بهره‌برداری بهینه از ذخایر دریایی کمک شایانی بنماید. ساختار ژنتیکی جمعیت موجودات دریایی می‌تواند تحت تاثیر عواملی مانند فاکتورهای فیزیکی دریا مثل جریانات اقیانوسی، جذر و مد و حتی تغییرات زمین‌شناختی قرار بگیرد. علاوه بر این فاکتورهای بیولوژیکی مثل پتانسیل جابجایی لاروها، استراتژی تولیدمثل و پتانسیل مهاجرت گونه (عمودی و افقی) می‌تواند بر چگونگی پراکنش افراد جمعیت یک گونه تاثیر فراوان بگذارد.

جنبشی بین‌المللی با نام جنبش خط شناسه‌ی زندگی[3] برای استفاده از توالی DNA در بخش‌هایی از ژنوم به عنوان یک شناسه‌ی مولکولی برای شناخت گونه‌های زنده‌ی کره‌ی زمین در کنار ابزارهای کلاسیک تاکسونومی شکل گرفته‌است. این پروژه به طور غیر رسمی در سال ۲۰۰۵ شروع شده است و اهمیتی دست کم در سطح

[1] Homoplasy
[2] Homoplastic
[3] Barcode of Life Initiative (BOLI)

پروژه‌ی ژنوم انسان دارد. Genome Canada و The Smithsonian Institution دو نمونه از سازمان‌های حمایت‌کننده‌ی پروژه هستند. کنسرسیوم بارکد زندگی (CBOL۴) یک مشارکت بین المللی در حال رشد است که مردم را در همه کشورها قادر خواهد کرد که تنوع زیستی را محافظت کنند (حاجی بابایی و همکاران ، ۲۰۰۷).

مفهوم DNA بارکدینگ اولین بار در سال ۲۰۰۳ توسط هبرت و گروه تحقیقاتی اش ازدانشگاه گولف وارد عرصه جامعه علمی شد. هبرت در مقاله خود تحت عنوان شناسایی زیست شناختی با استفاده از DNA بارکدینگ سیستمی نوین را برای شناخت و شناسایی گونه ها با استفاده از بخش کوچکی از DNA به عنوان بخش استاندارد ژنوم تعریف می‌کند.

توالی DNA در این روش می تواند در شناسایی گونه های مختلف به همان طریقی عمل کند که نوارهای بارکد UPCدر فروشگاهها به شناسایی کالاهای مصرفی کمک می کنند. ناحیه ژنی که برای شناسایی مورد استفاده قرار می گیرد ناحیه۶۴۸ نوکلئوتیدی در ژن سیتوکروم اکسیداز (COI[5]) میتوکندری می باشد که در سالهای گذشته نشان داده شده است در شناسایی پرندگان، پروانه ها، ماهیان،حشرات ، انگلها و پارازیتها بسیار موثر بوده است. مزیت عمده استفاده از COI آن است که علیرغم کوتاهی آن بخش از ژن میتوکندریایی و تعیین توالی سریع و ارزان آن، اطلاعات کافی را برای شناسایی و جدایی گونه های نزدیک فراهم می آورد.

از تنوع ژن‌هایی مانند 16S rDNA برای رده‌بندی پروکاریوت‌ها و 18S rDNA هسته‌ای و 16S rDNA میتوکندری برای رده‌بندی یوکاریوت‌ها استفاده شده است؛ کاربری این نشانگرها در یوکاریوت‌ها برای تمایز گونه‌های مختلف رویه‌ای یکنواخت و استاندارد نداشته است. از این رو، یافتن نشانگری بهتر ضروری بوده است. هم‌اکنون، برای شناسایی گونه‌های جانوران، ژن COI (زیر واحد ۱ سیتوکروم c اکسیداز) و تا اندازه‌ای هم cytb (سیتوکروم b) پذیرش عمومی پیدا کرده و کارایی مناسبی نشان داده‌اند. برای گروههای دیگر مانند گیاهان، آغازیان و قارچ‌ها ترکیبی از توالی‌های دیگر به این منظور برگزیده شده‌اند (حاجی بابابی و همکاران، ۲۰۰۷).

خط‌شناسه‌ی DNA روشی ژنتیکی برای شناسایی گونه‌ها در اختیار می‌گذارد؛ از آن‌جا که این رویکرد با تنوع ژنتیکی سروکار دارد، باید دید چه رابطه‌ای با شاخه‌هایی همچون ژنتیک جمعیت یا بررسی‌های فیلوژنتیک دارد. پرسش بنیادی‌تر این است که آیا این شیوه جایگزین تاکسونومی سنتی خواهد شد؟

به خاطر پیشرفت‌های پرشتاب سال‌های گذشته در زمینه‌ی توالی‌یابی DNA و روش‌های محاسباتی برای آنالیز داده‌ها، توالی‌های DNA به مهمترین و تند رشدترین منبع اطلاعاتی ما برای درک بهتر سیستم‌های زنده تبدیل شده‌اند. ردپای شیوه‌های مبتنی بر مقایسه‌ی توالی، در شاخه‌های گوناگون علوم زیستی، از نمو تا همه‌گیری‌شناسی دیده می‌شود. در این میان، دو زمینه از زیست‌شناسی روش‌ها و ابزارهایی را برای پی‌بردن به روابط میان جانداران از روی توالی DNA پدید آورده‌اند: ژنتیک جمعیت و فیلوژنتیک که سطوح سازمان‌یافتگی متفاوتی را

[4] Consortium for the barcode of life
[5] Cytochrome oxidase I

دنبال می‌کنند. ژنتیک جمعیت به بررسی گوناگونی درون جمعیت و میان جمعیت‌های یک گونه می‌پردازد، حال آن‌که فیلوژنتیک به بررسی هم‌ریشگی‌های ژرف‌تر گروه‌های دور و نزدیک در درخت فرگشت جانداران گرایش دارد. خط‌شناسه‌گذاری DNA جایگاهی در میانه‌ی این دو دارد: مرز میان گونه‌ها (حاجی بابایی و همکاران، ۲۰۰۷).

خط شناسه‌گذاری DNA بر این باور بنیادی استوار است که می‌توان توالی استاندارد کوتاهی را یافت که افراد یک گونه را از افراد گونه‌های دیگر جدا کند، زیرا تنوع درون گونه‌ای آن بسیار کمتر از تنوع میان‌گونه‌ای آن است. کارهایی که تاکنون انجام گرفته، کارایی این رویکرد را برای شناسایی گونه‌ها در گروه‌های بزرگی از جانوران همچون پرندگان، ماهی‌ها، سخت‌پوستان و نرم‌تنان نشان می‌دهد(کاستا[6] و همکاران ، ۲۰۰۷ ; هبرت[7] و همکاران ، ۲۰۰۴ ; وارد[8] و همکاران ، ۲۰۰۵ ; میکلسون[9] و همکاران ، ۲۰۰۷).

در سال ۲۰۰۳ محققین دانشگاه گولف در اونتاریو ، DNA بارکدینگ (خط شناسه گذاری DNA) را بعنوان یک روش برای شناسایی گونه ها و تعیین روابط بین آنها پیشنهاد کردند. DNA بارکد (خط شناسه DNA) توالی خاص حفاظت شده ای در موجودات مختلف می باشد که به صورت استاندارد مورد استفاده قرار می گیرد. DNA بارکدینگ به عنوان روشی مناسب برای شناسایی، مطالعه و بررسی تنوع ژنتیکی در سطح گونه ها و همچنین تحقیقات در زمینه تنوع زیستی و تاکسونومی معرفی شده است. تعداد زیادی از توالی DNA بارکد ها در کتابخانه بارکدها جمع آوری شده است که دور نمای افقی از ژنومیک، با کاربردهای وسیع در حیطه فیلوژنتیک، ژنتیک جمعیت، سیستماتیک و غیره را مهیا می نماید.

در تاکسونومی، DNA بارکدینگ برای شناسایی مرسوم نمونه ها به کار می رود، در حالیکه در مطالعات انتخاب فیلوژنتیک DNA بارکدینگ به عنوان نقطه آغازی برای انتخاب بهینه تاکسون به کار می رود و توالی بارکدها به پایگاه داده ها برای آنالیز فیلوژنتیکی اضافه می شود. در ژنتیک جمعیت ، بررسی DNA بارکدها اطلاعات اولیه از اندازه و تنوع ژنتیکی جمعیت را بیان می کند (عشوریون و همکاران ،۱۳۸۸).

امروزه بررسی مطالعات جمعیتی تنوع ژنتیکی آبزیان بیشتر با استفاده از DNA هسته ای و میتوکندری صورت می پذیرد و هدف از این قبیل مطالعات نیز، بیشتر تعیین وجود ساختار ژنتیکی آبزیان بوده است و در سایر موارد هدف، شناسایی تقسیمات تاریخی و تغییرات جغرافیایی زیستی می باشد. نتیجه کاربردی چنین مطالعاتی، ایجاد نشانگرهای ژنتیکی به منظور استفاده در مدیریت ذخائر ماهیان است. بررسی های DNA میتوکندریایی کاربرد های متعددی را در زیست شناسی آبزیان از جمله تعیین تغییرات بین افراد، بررسی تغییرات درون و بین جمعیتی، بررسی تاکسونومیکی تغییرات درون گونه ای و دیگر سطوح طبقه بندی مانند جنس ها دارد. در حال حاضر

[6] Costa et al. (2007)
[7] Hebert et al. (2004)
[8] Ward et al. (2005)
[9] Mikkelsen et al. (2007)

روشن است که در بسیاری از گونه های ماهیان DNA میتوکندریایی[10] دارای تغییرات قابل ملاحظه ای بوده و این تغییرات را می توان مبنای تفکیک قرار داد (براون[11]و همکاران، ۲۰۰۸ ; هبر ، ۱۹۹۱). همچنین در مواردی که برنامه های تکثیر و رها سازی ماهی به منظور احیاء ذخائر ماهیان ساکن آبهای طبیعی صورت می گیرد، تفکیک ماهیان ساکن و ماهیان رهاسازی شده نیازمند ارزیابی تنوع طبیعی mtDNA در محیط می باشد که با انجام این امر ماهیان رها سازی شده را می توان شناسایی نمود (استرانگ و بیلینگتون[12]، ۱۹۹۵).

۲-۱- انگیزه‌های رو کردن به تاکسونومی مولکولی

کاستی‌های تاکسونومی سنتی بر پایه‌ی ریخت‌شناسی کم نیست: اشتباه گرفتن تنوع درون‌گونه‌ای یا دوشکلی جنسی به جای تفاوت گونه‌ای، یکسان پنداشتن گونه‌های ظاهراً شبیه به هم، ناکارایی کلیدهای شناسایی برای مراحل پیش از بلوغ چرخه‌ی زندگی، نبود خصوصیات ریختی مشترک و قابل مقایسه در میان تاکسون‌های گوناگون، نیاز به متخصصان ویژه برای هر گروه از جانداران– آن هم هنگامی که شمار این متخصصان در جهان رو به کاهش است– از آن جمله‌اند (هبرت و همکاران ۲۰۰۳). تاکسونومی مولکولی در پی جبران این کاستی‌ها تا حد ممکن است و آن را با دو رویکرد دنبال می‌کند: یک، تعریف تاکسون‌های جدید یا بازآرایی تاکسون‌های شناخته شده بر پایه‌ی اطلاعات مولکولی و دو، به‌کارگیری داده‌های مولکولی برای نسبت دادن نمونه‌های جدید به گونه‌های تعریف شده از سوی تاکسونومیست‌ها.

برای طبقه بندی جانداران از طریق مورفولوژیکی به یک تاکسونومیست ماهر احتیاج است، چه بسا اگر جاندار در مرحله بلوغ از دوران رشدی خود نباشد، تاکسونومیست ها از شناسایی آن عاجز هستند، در حالیکه DNA بارکدینگ در این رابطه راهکار مناسبی می باشد. DNA بارکدینگ درتحقیقات تاکسونومیک، ژنتیک جمعیت و ترسیم درخت فیلوژنتیک استفاده می شود. در تاکسونومی، DNA بارکدینگ با روشهای رایج مورفولوژیکی همکاری می کند و در واقع ابزاری برای کمک به سیستم تاکسونومی سنتی می باشد ولی اگر نمونه ای نامشخص باشد و اطلاعات مربوط به آن در کتابخانه موجود نباشد بوسیله توالی بارکد مربوط به آن نمی توان نمونه ناشناخته را به عنوان گونه ای جدید معرفی نمود، یعنی قبلاً نیازمند بررسی های مورفولوژیکی می باشد. از طرف دیگر DNA بارکدینگ با سرعت بخشیدن به تقسیم بندی گروههای ژنتیکی در گونه هایی که از نظر تاکسونومی بسیار کمتر مطالعه شده اند موثر می باشد بعنوان مثال طبقه بندی هزارپای شمال غرب کاستاریکا که از ۲۵ سال پیش شروع شده بود، تنها پس از کشف بارکدینگ، ۲۵۰۰۰ بارکد را در قالب ۲۰۰۰ گونه، در عرض ۳ سال شناسایی نمود (هبرت و همکاران، ۲۰۰؛ حاجی بابایی و همکاران، ۲۰۰۷).

[10] Mitchondrial DNA
[11] Brown et al. (2008)
[12] Billington & strange

در بررسی‌های فیلوژنتیک، خط‌شناسه‌گذاری می‌تواند به انتخاب بهتر و درست‌تر تاکسون‌ها کمک کند. نشان داده شده است که افزودن گونه‌های بیش‌تر به یک آنالیز فیلوژنی ارزشمندتر از افزودن لکوس‌های بیشتر است. از سوی دیگر، داده‌های خط‌شناسه می‌تواند ارزیابی اولیه‌ای از مقدار تنوع درون جمعیت‌های مختلف در شرایط اکولوژیک و جغرافیایی گوناگون به دست دهد و نامزدهای مناسبی را برای مطالعات بیش‌تر معرفی کند. در هر دو گروه مطالعات جمعیتی و فیلوژنتیک چند لکوسی، می‌توان داده‌های خط‌شناسه را به داده‌های دیگر افزود، به ویژه که فرمت یکسانی برای گروه‌های بزرگی از جانداران دارد و امکان پژوهش‌های مقایسه‌ای را به خوبی فراهم می‌کند (حاجی بابایی و همکاران ،۲۰۰۷).

جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی در ابتدا از توالی ژنهای ساده و عمومی مثل ژنهای ریبوزومی استفاده می شد در حالیکه با گذشت زمان، آنالیزهای فیلوژنتیکی جدید با استفاده از اطلاعات توالی مکانهای ژنی چند گانه حاصل از پیشرفت های بدست آمده در زمینه توالی یابی کل ژنوم، انجام می شود. در مورد ترسیم درخت فیلوژنتیکی نیز DNA بارکدینگ در جهت تاکسون مناسب کمک می کند. بارکدهای DNA اساس و پایه ژنومیکی مناسب برای ژنهای مورد استفاده در ترسیم درخت فیلوژنتیکی فراهم می کند که این امر در تحقق تفکیک دقیق بین شاخه های عمیق و سطحی درخت فیلوژنتیکی موثر می باشد (فلسنستین[۱۳]، ۲۰۰۴).

هم اکنون برای بدست آوردن تنوع ژنتیکی و پلی مورفیسم موجود در جمعیت به جای روشهای قدیمی مارکرها و ایزوآنزیمها می توان از آنالیز DNA بارکد استفاده کرد. گرچه اطلاعات توالی جمع آوری شده برای بارکدینگ DNA کافی نیست ولی بینش اولیه در مورد تنوع ژنومیک داخل یک گونه را فراهم می آورد. در تاکسونومی، DNA بارکدینگ برای شناسایی مرسوم نمونه ها به کار می رود، در حالیکه در مطالعات انتخاب فیلوژنتیک، DNA بارکدینگ به عنوان نقطه آغازی برای انتخاب بهینه تاکسون به کار می رود و توالی بارکدها به پایگاه داده ها برای آنالیز فیلوژنتیکی اضافه می شود. در ژنتیک جمعیت، بررسی DNA بارکدها اطلاعات اولیه از اندازه و تنوع ژنتیکی جمعیت را بیان می کند (عشوریون و همکاران، ۱۳۸۸).

در این تحقیق از یک نشانگر برای شناسایی بین گونه ای بنام COI در بخش اول تحقیق، از نشانگر D-LOOP در بخش دوم و نشانگر میکرو ساتلایت (ریز ماهواره) در بخش سوم برای شناسایی درون گونه‌ای استفاده شده که در ادامه توضیح داده می شود.

۳-۱- کاربردهای DNA بارکدینگ

DNA بارکدینگ بعنوان حلقه گمشده در علم تاکسونومی محسوب می شود و می تواند بسیاری از عیب های روش های سنتی را تا حدود زیادی برطرف می کند. DNA بارکدینگ در ترسیم بهتر درخت حیات و روابط

[13] Felsenstein

فیلوژنتیکی بین موجودات تأثیر بسزایی دارد. DNA بارکدینگ در جنبه کاربردی خود به کمک بشر می شتابد و بعنوان اسلحه ای در دست انسان برای شناسایی عوامل مضر در پزشکی و کشاورزی و مبارزه به موقع با آنها می باشد و همچنین می تواند در زمینه حفاظت منابع و محیط زیست بسیار تأثیرگذار باشد (عشوریون و همکاران ۱۳۸۸).

DNA بارکدینگ نه تنها در امر طبقه بندی موجودات زنده به کمک تاکسونومیست ها و روش سنتی طبقه بندی شتافت، بلکه در زمینه های دیگر نیز انسان را یاری نمود از جمله:

- کنترل آفات کشاورزی و در نتیجه کاهش فقر و گرسنگی: DNA بارکدینگ امکان شناسایی آفات و بیماریهای محصولات کشاورزی را در هر مرحله از مراحل نموی میسر می سازد.
- شناسایی ناقلان بیماری برای مبارزه با بیماریها: DNA بارکدینگ به غیر تاکسونومیست ها در امر شناسایی ناقل ها کمک می کند و گسترش عوامل بیماری زا و ناقل ها را محدود می کند.
- حفاظت منابع طبیعی و حمایت از گونه های در حال انقراض : مأموران و مدیران منابع طبیعی می توانند با تکنیک DNA بارکدینگ به کشف خرید و فروش غیر قانونی محصولات آنالیز شده بپردازند. همچنین مجریان قانون به کمک این تکنیک می توانند به شناسایی گوشت حیوانات در حال انقراض در بازارهای محلی بپردازند.
- آگاهی از کیفیت آب: آب یک منبع ارزشمند است که سلامتی رودخانه ها، رودها و دریاچه ها که اغلب با اندازه گیری ارگانیسم ها در آن محک زده می شود. DNA بارکدینگ برای بررسی این گونه شاخص ها استفاده می شود که بدون استفاده از این روش شناسایی آنها بسیار مشکل است. فعالان بخش محیط با استفاده از این روش کیفیت آب را بهبود بخشیده و منابع آب نوشیدن را با اطمینان بیشتر تأمین می کنند (عشوریون و همکاران ۱۳۸۸).

۱-۳-۱- فواید DNA بارکدینگ برای کشور

- شناسایی سریع و ارزان نمونه ها
- توانایی بهتر برای کنترل و جابجایی گونه ها در مرزهای ملی
- فرصت هایی برای آموزش دانشجویان و پژوهشگران منطقه ای
- به کارگیری پژوهشگران منطقه ای در شبکه های جهانی و ابتکار عمل های تنوع زیستی

ایجاد فرصتهایی جهت بهبود زیرساخت های تحقیقات ملی در زمینه های کلکسیون های نمونه، آزمایشگاههای زیست شناسی مولکولی و پایگاههای داده های تنوع زیستی (اولین همایش جایگاه DNA بارکدینگ در آرایه شناسی ، ۱۳۹۰).

۲-۳-۱- شناسایی گونه‌های زیستی با خط‌شناسه‌ی DNA با استفاده از نشانگر COI

پیشنهاد آغازین در سال ۲۰۰۳، هبرت و همکاران، در مقاله‌ای که در شاخه‌ی علوم زیستی ژورنال جامعه سلطنتی لندن به چاپ رسید، استفاده از نشانگر COI را به عنوان خط‌شناسه‌ی عمومی برای شناسایی گونه‌های جانوری پیشنهاد دادند(هبرت و همکاران، ۲۰۰۳). این مقاله را می‌توان سرآغاز جنبش خط‌شناسه‌گذاری دانست. این مقاله برای جنبش خط‌شناسه‌گذاری اهمیت تاریخی شایانی دارد. DNA بارکدینگ بر اساس توالی کوتاه استاندارد شده ای بنا شده است که سبب تمایز بین تک گونه ها به علت تنوع ژنتیکی درون جمعیت می شود. برای اینکار میتوان از قطعات مختلفی برای بیوسیستماتیک گونه های مختلف استفاده کرد (هبرت ، ۲۰۰۳).

۴-۱- دلایل استفاده از ژنوم میتوکندریال

بالغ بر سه دهه است که DNA میتوکندریایی بعنوان یک مارکری است که برای تنوع مولکولی زیاد استفاده می شود. در تحقیقی که توسط گالتیر[۱۴] و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد استفاده از DNA میتوکندری برای توصیف و شناسایی گونه ها ارزیابی شد و از mtDNA بعنوان یک پتانسیل عظیم برای آنالیز تکامل و عملکرد ژنوم میتوکندریایی ذکر گردید.

هر مطالعه مولکولی از گونه های حیوانی در مزرعه شامل هاپلوتیپ mtDNA در برخی از مراحل می باشد. یک قطعه از میتوکندری، COX1، اخیراً بعنوان ابزار استانداردی برای تاکسونومی مولکولی و شناسایی مولکولی استفاده می شود (راتناسینگهام[۱۵] و هبرت، ۲۰۰۷).

ژنوم میتوکندری یک نشانگر ژنتیکی میباشد که به طور گسترده‌ای برای مطالعات ژنتیکی کاربرد دارد. مارکرهای DNA میتوکندری (mtDNA) بطور گسترده در مطالعات فیلوژنتیکی مولکولی به کار برده می شود. اما مسئله مهم این است که کدام یک از ژنهای DNA میتوکندری در تشخیص گونه ها نقش دارد، زیرا قسمت های مختلف ژنوم میتوکندریال طی جهش های متنوع فراوان، تکامل می یابد. انتخاب ژن مناسب با قدرت بالای تفکیک پذیری فیلوژنتیکی، در تعیین حدود گونه های انشعاب یافته ی جدید اهمیت دارد. DNA میتوکندریال دارای سرعت بالایی برای ایجاد تغییر در توالی و ترتیب نوکلئوتیدهای خود می باشد. به همین دلیل تغییرات آشکاری را بطور منظم در میان گونه های خویشاوند نزدیک نشان می دهد. مسأله مهم این است که تفاوت های موجود در توالی DNA میتوکندریال گونه ها دیده می شود در اغلب موارد آنقدر کوچک وجزئی اند که نمی توان گونه ها را از هم جدا در نظر گرفت و از طرف دیگر اشتراک قبلی پلی مورفیسم هاپلوتیپ و نقش آن این مسأله را حادتر می‌کند (هاینز و همکاران[۱۶]، ۱۹۹۶؛ اودن[۱۷]، ۱۹۹۰).

---

[14] Galtier et al. (2009)
[15] Ratnasingham
[16] Hynes et al. (1996)
17 Ovenden

بر همین اساس کر[۱۸] و همکاران (۲۰۰۷) که روی تعداد بیشتری از گونه ها و نمونه ها کار می کردند، دریافتند که بین طبقات پرندگان که قادر به ایجاد دورگه بودند، تفاوت های میان گونه ای کمتر وجود دارد. علاوه بر ژن COX1، مارکرهای میتوکندریایی دیگری نیز در مهره داران توالی یابی شده اند که کارایی زیادی در فیلوژنتیک دارند و یا به عنوان مکمل COX1 طی DNA بارکدینگ استفاده می شوند. در دوزیستان ژن ۱۶SrRNA یک عنوان یک مارکر مکمل DNA بارکدینگ پیشنهاد شده است و ژن سیتوکروم b نیز که نوعی پروتئین را رمز می کند به عنوان یک مارکر در تعیین مرز بین گونه ها معرفی شده است (کر و همکاران، ۲۰۰۷).

با توجه به اینکه میتوکندری منشأ مادری دارد و نوترکیبی در آن انجام نمی‌گیرد، لذا این خصوصیات باعث بروز اختلاف ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته شده است و از اینرو نشانگر خوبی برای تشخیص گروه‌هایی که برای ۱۰، ۱۰۰ یا ۱۰۰۰ سال از هم جدا بوده‌اند می‌باشد (بیلینگتون، ۱۹۹۸).

mtDNA یک ابزار قوی به منظور مطالعات و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت ها می‌باشد که می‌تواند به دلایل زیر باشد:

۱- سرعت بالای تکامل mtDNA در مقایسه با DNA هسته از آن یک کاندیدای خوب و مناسب برای مطالعات تکاملی می‌سازد در واقع این ویژگی و قدرت تفکیک و دقت مطالعات را در سطح جمعیتی بهبود می‌بخشد (موریتز و همکاران[۱۹]، ۱۹۹۴؛ براون ،۱۹۸۳).

کار کردن با این مولکول آسان است، اندازه کوچکی دارد و دارای ژنهای دست نخورده می باشد (ویلسون [۲۰]و همکاران، ۱۹۸۵).

۲- اگر چه ژنها در این مولکول دست نخورده باقی مانده اند ولی میزان جهش بالاست. منطقه ای که ژنی را کد نمی کند(حلقه D) در خیلی از رده ها به سرعت تکامل می یابد. نرخ بالای جهش در DNA میتوکندریایی ممکن است است تا حدودی در نتیجه محصولات فرعی تنفس سلولی و همچنین عدم مکانیسم های تعمیر کننده در مقایسه با DNA هسته ای است (ویلسون و همکاران ۱۹۸۵).

۳- mtDNA از مادر به فرزند می‌رسد (هاچینوسون[۲۱] و همکاران، ۱۹۷۴؛ اویز و ویرجنهوک[۲۲]، ۱۹۸۷؛ می و گرو[۲۳]، ۱۹۹۳). به این مفهوم که تمام فرزندان، بدون توجه به جنسیت، ژنوتیپ هاپلوئید mtDNA مادرشان را به ارث می‌برند. در نهایت به دلیل اینکه mtDNA هاپلوییید بوده و از یک والد به ارث می رسد اندازه جمعیت آن یک چهارم اندازه جمعیت DNA هسته ای هاپلوییید می باشد. بدون شک مطالعاتی که بر اساس توالی یابی مناطق

18 kerr et al. (2007)
19 Moritz et al. (1994)
20 Wilson et al. (1985)
21 Hutchinoson et al. (1974)
22 Avise & Virjenhock
23 May and Grew

با تنوع بالای DNA میتوکندریایی صورت می پذیرد ساختارهای شجره شناسی جغرافیایی یا فیلوژنتیکی گونه های نزدیک به هم و همچنین ساختار ژنتیکی جمعیتهای مختلف آبزیان را معلوم می سازد (اویز، ۱۹۹۴).
۴- در mtDNA نوترکیبی صورت نمی‌گیرد. این خاصیت باعث بروز اختلافات ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته می‌گردد (براون، ۱۹۸۳). در واقع فرزندان تقریباً همان ژنوم میتوکندریایی مادر را دریافت می کنند (وایت[۲۴] و همکاران، ۲۰۰۸؛ براون و همکاران، ۲۰۰۸).

۵-۱- دلایل برگزیدن ژن *COI*

به نظر میرسد در جانوران ژن‌های میتوکندریایی به خاطر نداشتن اینترون، وراثت تک‌والدی و محدود بودن نوترکیبی هدف بهتری برای شناسایی گونه‌ها به نسبت ژن‌های هسته‌ای باشند. بسیاری از مطالعات پیشین بر ژن-های DNA ریبوزومی ۱۲S و ۱۶S متمرکز شدند. وجود جهش‌های حذف و اضافه[۲۵] در این ژن‌ها، همردیفی توالی‌ها را پیچیده می‌کند. ۱۳ ژن رمزگردان پروتئین در میتوکندری هدف‌های بهتری هستند زیرا حذف و اضافه بسیارکمتر دارند. از میان این ژن‌ها COI دو مزیت نسبی دارد: نخست، پرایمرهای عمومی خیلی خوبی برای این ژن در دسترس هستند که امکان تکثیر سر َ۵ آن را در گروه‌های زیادی از جانوران فراهم می‌کنند. دوم، به نظر می‌رسد این ژن بیش‌تر از هر ژن میتوکندریایی دیگری سیگنال‌های فیلوژنتیک با خود داشته باشد. به نظر می‌رسد که کارایی این ژن در استنباط فیلوژنی کمی ژرف‌تر از سطح گونه، بهتر از ژن‌های مشابه مانند DNA باشد. سرعت تکامل این ژن حدود ۳ برابر ژن‌های DNA ریبوزومیS ۱۲ و S ۱۶ است. به این ترتیب، علاوه بر تفکیک گونه‌های نزدیک، توالی DNA می‌تواند گروه‌های زیر سطح گونه را نیز از هم جدا کند (هبرت و همکاران، ۲۰۰۳). مواد ژنتیکی اعم از کروموزمی یا خارج از کروموزمی در معرض تغییرات و جهش‌های دائمی قرار دارند و عوامل فیزیکی و شیمیایی از درون سلول یا بیرون از ارگانیسم در هنگام همانندسازی سبب جابجایی در ترتیب نوکلئوتیدهای DNA می‌شوند (هبرت و همکاران، ۲۰۰۳).

۶-۱- مزایای بارکد گذاری DNA در ژن COX1 نسبت به ۱۶s و سیتوکروم b

میزان درستی روش بارکدینگ DNA بر اساس فاصله به میزان جدایی بین انشعابات درون گونه ای و میان گونه ای مارکر مورد نظر بستگی دارد. شرایط مناسب برای بارکدینگ فاقد هر گونه هم پوشانی بین این دو مقدار است. استفاده از ژن های ۱۶sو سیتوکروم b باعث شده که بتوان هم پوشانی بین فواصل میتوکندریایی درون گونه ای و میان گونه ای را در انواع بیشتری از طبقات نسبت به مطالعات پیشین اندازه گرفت (هبرت و همکاران، ۲۰۰۳). اگر همه گونه های یک ژن با هم قیاس شوند یک اختلاف وسیع بین انشعابات درون گونه ای و میان

[24] White et al. (2008)
[25] Insertion/Deletions, indels

گونه ای در ژن های COX1 و سیتوکروم b وجود دارد. در حالیکه این اختلاف در ژن ۱۶sکمتر آشکار است. این مسأله نشان می دهد که ژنهای rRNA میتوکندریایی با وجود فواید بسیاری که دارند برای شناسایی گونه ها زیاد مناسب نیستند. مطالعات انجام شده نشان داده که تنوع توالیCOX1 قادر است بخش عمده ای از انشعابات توالی جفت گونه ها را بطور صحیح و متناظر با تنوع درون گونه شناسایی کند (هبرت و همکاران، ۲۰۰۳).

۷-۱- ژن D-LOOP

در زیست شناسی مولکولی، D-LOOP ساختار DNA است که در آن دو رشته DNA بخاطر کشیدگی جدا از هم هستند و بوسیله یک رشته سوم از هم جدا نگه داشته می شوند. رشته سوم یک توالی بازی مکمل یکی از رشته های اصلی DNA است، پس جابجایی رشته سوم با رشته دوم از DNA دو رشته‌ای انجام می شود. بنابراین در این منطقه ساختار DNA سه رشته ای است (کاساماتسو[۲۶] و همکاران، ۱۹۷۱). DNA میتوکندریایی شامل یک منطقه غیرکدینگ که منطقه کنترل (CR۲۷ یا D-LOOP) نامیده می شود که بواسطه نقش آن در رونویسی و رونوشت برداری است. قطعه D-LOOP دارای سطح تنوع بالاتر مقایسه ای نسبت به توالیهای کد کننده پروتئین نشان می دهد که بواسطه فشارهای انتخاب کمتر در این منطقه است. طول D-LOOP تقریباً ۱ kb است و به آسانی بوسیله PCR۲۸ قبل از توالی یابی تنوع مولکولی را نشان می دهد. آنالیز توالی CR خرس برای اندازه گیری تنوع مولکولی به منظور شناسایی واحدهای نگهداری شده برای مدیریت بهتر این گونه ها کاربرد دارد (اونوما۲۹ و همکاران، ۲۰۰۶). دابل یو یو۳۰ و همکاران (۲۰۰۶) یک بخش از منطقه CR میتوکندریال را برای ارزیابی ساختار جمعیت و جریان ژنی در بین جمعیتهای Black Muntjac (مونتیاکوس کرینی فرونز[۳۱]) با استفاده از نمونه های جمع آوری شده از سه جمعیت بزرگ است(دابل یو یو و همکاران، ۲۰۰۶). یکی از موارد استفاده از D-LOOP بعنوان قسمت پایانی بازوی D در مولکول tRNA است. D-LOOP در موقعیتهای ویژه شامل تعمیرDNA ، در تلومرها و بعنوان یک ساختار نیمه ثابت در مولکولهای DNA حلقوی میتوکندریایی اتفاق می افتد (کاساماتسو و همکاران، ۱۹۷۱). D-LOOP در منطقه غیر کدینگ اصلی از DNA میتوکندریایی اتفاق می افتد و آن منطقه را منطقه کنترل یا D-LOOP گویند (دودا و همکاران[۳۲]، ۱۹۸۱). رونویسی از DNA میتوکندریایی از منطقه D-LOOP اتفاق می افتد (فیش و همکاران[۳۳]، ۲۰۰۴). منطقه D-LOOP شامل پروموتورهایی برای رونویسی RNA از رشته DNA میتوکندریایی است که در مجاورت ساختار D-LOOP قرار دارند (آکوچکیان[۳۴] و همکاران، ۲۰۰۹).

---

[26] Kasamatsu et al. (1971)
[27] Control Region
[28] Polymerase Chain Reaction
[29] Onuma et al. (2006)
[30] Wu et al. (2006)
[31] Muntiacus crinifrons
[32] Doda et al.(1981)
[33] Fish et al. (2004)
[34] Akouchekian et al. (2009)

۸-۱- طبقه بندی میگو

سخت پوستان (Crustacea) بزرگترین زیر شاخه ازشاخه بندپایان (Sub phylum) به شمار می‌آیند که بیش از ۴۲۰۰۰ گونه را در خود جای داده‌اند، اکثراً دریازی بوده و تعدادی نیز ساکن آبهای شیرین، برخی خشک‌زی به شمار می‌آیند. این زیر شاخه دارای ۱۰ رده (Class) است که در این میان سخت‌پوستان عالی (Malacostraca) از جایگاه ویژه‌ای برخوردارند که حدود ۳/۴ گونه‌های سخت‌پوستان را شامل می‌شوند. راسته ده پایان (Decapoda) که به دلیل داشتن ۱۰ پا (۵ جفت پای قدم زن) به این نام خوانده شده است از این رده منشأ گرفته‌اند، دارای زیر راسته Penaeidae هستند. مهمترین و بیشترین اقلام سخت‌پوستان تجاری به این زیر راسته تعلق دارند که از دو فوق‌خانواده Sergestoidea و Penaeoidae تشکیل شده‌است. فوق‌خانواده Penaeoidae دارای چهار خانواده است که خانواده Penaeidae بزرگترین زیرخانواده و دارای بیش از ۳۰۰ گونه در سراسر جهان بوده که در ۱۲ جنس جای گرفته‌اند و تقریباً ۸۰ درصد آنها از نظر تجاری به صورت صید مهم هستند. تمامی ۲۴ گونه میگویی که به نوعی در جهان تکثیر می‌شوند و پرورش می‌یابند متعلق به این خانواده هستند.

جدول ۱-۱ : طبقه‌بندی میگوهای پناییده

شاخه	(Phylum):	بندپایان	Arthropoda
رده	(Class):	سخت پوستان	Crustacea
زیر رده	(Sub class):	سخت پوستان عالی	Malacostraca
سری	(Series):	سخت پوستان عالی حقیقی	Eumalacostraca
فوق راسته	(Superorder):	خرچنگهای حقیقی	Eucarida
راسته	(Order):	ده پایان	Decapoda
زیر راسته	(Sub order):	ده پایان شناگر	Dendrobranchiata Natantia
دون راسته	(Infra order):	پناییده آ	Penaeidea
فوق خانواده	(Super Family):	پنااوئیده	Penaeoidae
خانواده	(Family):	پناییده	Penaeidae
جنس	(Genus):	پنئوس	Penaeus
گونه	(Species):	سمی سولکاتوس	Semisulcatus
گونه		مونودون	Monodon
گونه		مرگوئنسیس	Merguensis
گونه		ایندیکوس	Indicus
گونه		وانامی	Vannami

۹-۱- اهمیت شیلاتی در جهان و ایران

صید و صیادی در سواحل خلیج فارس و دریای عمان ثابت کرده که میگو در امتداد سواحل اختصاصی ایران به وفور وجود دارد و میران صید آن در اطراف بندر دیلم، راس المطاف و بندر عباس، بیش از سایر صیدگاه هاست

(نوربخش، ۱۳۷۰). درآبهای خلیج فارس و دریای عمان، حدود ۱۸ گونه میگو شناسایی شده اند، که بهره برداری اقتصادی برای صادرات از ۲ گونهٔ آن که درشت تر و فراوان تر ند، صورت می گیرد و مهمترین گونهٔاقتصادی از نظر صید و صیادی، میگوی ببری سبز *Penaeus semisulcatus* است، که در بیشتر زیستگاه های خلیج فارس و دریای عمان یافت می شود، اما بیشترین پراکنش و صید آن در آبهای ساحلی استان بوشهر به ثبت رسیده است. میگوی موزی *Penaeus merguensis* که از نظر تجاری در ردهٔ دوم اهمیّت قرار دارد. بیشتر درآب های استان هرمزگان به بهره برداری رسیده است. سایر گونه ها مثل میگوی سفید هندی *Penaeus indicus*، میگوی ژاپنی *Penaeus japonicus* علی رغم داشتن جثّهٔ درشت، به دلیل کمی تعداد و محدودیت زیستگاه، مورد بهره‌برداری اقتصادی قرار نمی‌گیرند. سه گونه میگوی خنجری، سفید و ریز سفید در سر تا سر خلیج فارس ودریای عمان به صورت پراکنده موجود است امّا ارزش صادراتی ندارند. بهره برداری از این سه گونه بیشتر برای مصرف در بازارهای محلی و منطقه ای صورت می گیرد (متین فر، ۱۳۸۶).

از کوچک‌ترین نوع میگوهای خلیج فارس و سواحل شمال غربی آن که در زبان محلی به آنها «سرتیز» و «کنتک» می‌گویند برای تهیهٔ کنسرو استفاده می‌شوند.

رشد روز افزون جمعیت و کمبود مواد پروتئینی در کشورهای در حال توسعه مشکلاتی جدی برای نیازهای غذایی مردم به وجود آورده است و طبق نظریه کارشناسان سازمان خوار و بار و کشاورزی ملل متحد از میزان ۱۰۰ میلیون تن صید آبزیان تنها حدود ۳۰۳ هزار تن مربوط به ایران بود که رقم بسیار پایینی است (شرکت بازرگانی شیلات ایران، ۱۳۶۹؛ ۱۳۷۰). بررسی آمار صید ۱۵ سال اخیر میانگین بهره برداری سالانه ۶۴۰۰ تن میگو از صیدگاه های خلیج فارس و دریای عمان نشان می دهد که زمینهٔافزایش تولید میگو تنها از بعد آبزی پروری ثبات یافته است (متین فر، ۱۳۸۶).

میگو این جاندار گرانبها اگر به میزان کافی تکثیر و پرورش یابد و صید دریایی آن نیز با ناوگان صیادی مدرن و مجهز صورت گیرد و همچنین بازاریابی وفروش بین المللی در اختیار باشد می تواند پس از نفت و گاز درآمد عمده ای را در امر صادرات کشور داشته باشد با در نظر گرفتن ارزش جهانی میگو و قیمت متوسط هر کیلوگرم ۵ تا ۱۰ دلار، اهمیت این محصول گرانبها و ارزش صا دراتی آن مشخص می شود..

در چهار چوب اقتصاد ملی کشورهای منطقه سهم بخش شیلات در تولید ناخالص داخلی حدوداً زیر یک درصد است و تجارت ماهی و میگو قسمت کوچکی از کل صادرات و واردات را تشکیل می دهد در اواخر سالهای ۱۹۵۰ میگوی خلیج فارس با کشتیهای صنعتی و سنتی و به وسیلهٔ تورهای صنعتی ترال، مورد بهره برداری قرار می گرفت و در سالهای ۶۸-۱۹۶۷ صید میگو به اوج خود یعنی ۱۷/۰۰۰ تن رسید اما درسالهای ۷۱-۱۹۷۰ به طور چشمگیری کاهش یافت و به حدود ۱۰/۰۰۰ تن در سال رسید. در سال ۱۹۸۵ این رقم حدود ۹/۰۰۰ تن (توسط فائو) اعلام گردید که عمدتاً از گونه پنئوس سمی سولکاتوس و پنئوس ایندیکوس در نواحی شمالی خلیج فارس و گونه متاپنئوس آفیننیس و پنئوس مرگوئنسیس در دریای عمان و خلیج فارس است (مجیدی

نسب،۱۳۷۷). بر اساس آمار منتشرشده از سوی سازمان شیلات ایران، میزان پرورش میگو در آب شور در سال ۲۰۰۶ (۵۷۰۰ تن) و در سال ۲۰۰۷ (۲۵۰۸ تن) ،همچنین در سالهای مشابه میزان صید به ترتیب ۵۹۵۱ و ۷۴۵۰ تن گزارش شده است (سالنامه آماری شیلات، ۱۳۸۶).

۱۰-۱- انواع گونه های میگو

میگوها گسترش جهانی دارند، در دریاها، آبهای لب شور، شیرین نواحی استوایی تا مناطق قطبی یافت می شوند. اکثر گونه های تجاری میگو که تکثیر و پرورش آنها در بسیاری از کشورهای دنیا صورت می گیرد از جنس پنئوس هستند که در آبهای گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا در عرض های جغرافیایی از ۴۰ درجه شمالی تا ۴۰ درجه جنوبی پراکنده هستند.

تقسیم بندی میگوها از نقطه نظر درجه شوری مکان زیست:

میگوهای دریازی (جنس پنئوس)

میگوهای آب شیرین (جنس ماکروبراکیوم)

تقسیم بندی میگوها از نقطه نظر درجه حرارت مکان زیست:

میگوهای آبهای سرد: درآبهایی به سر می برند که حداکثر درجه حرارت در فصل تابستان ۲۰ درجه است. مهمترین اقلام تجاری این گروه متعلق به خانواده پاندلیده است.

میگوهای آب گرم: در آبهایی به سر می برند که حداقل درجه حرارت در فصل زمستان ۲۰ درجه است. مهمترین اقلام تجاری این گروه، گونه هایی هستند که در خلیج فارس و دریای عمان وجود دارند.

میگوهای آبهای معتدل: درنواحی معتدل یافت می شوند و دامنه حررت مطلوب برای آنها ۲۰- ۳۰ درجه است. مانند میگوی چینی و ژاپنی

تقسیم بندی میگوها از نقطه نظر نحوهٔ زیست:

- گروه مهاجر یا سرگردان
- گروه خزنده یا حفار

تقسیم بندی میگوها از نظر چرخهٔ زندگی :

- میگوهای پلاژیک (Plago penaeus) که تمام چرخه زیستی آنها در دریاهاست.
- میگوهای که منحصراً در خورها هستند (Meta penaeus).
- گونه هایی که در دریا تخم ریزی می کنند، نوزاد مراحلی از رشد و جنینی خود را در دریا به سرمی برد، سپس به خور مراجعت کرده و مراحل sub adult خود را در خور می گذراند. مثل *Penaeus merguensis*

- گونه هایی که در دریا تخم ریزی می کنند، مراحل اولیه رشد و نمو جنینی خود را در دریا به سرمی برد ، سپس به سواحل مراجعت کرده، مراحلی از رشد و نمو و تغذیه را در ساحل (نه خور) می گذراند و بعد به ساحل دریا باز می گردند. مثل *Penaeus semisulcatus*

از مهمترین گونه های تجاری ماکروبراکیوم می توان به گونه های *Macrobrachium American* (سواحل صخره ای– شنی کالیفرنیا تا پرو) ،*Macrobrachium carinus* (سواحل صخره ای – شنی فلوریدا تا برزیل) ، *Macrobrachium rosenbergii* (سواحل گلی– شنی ایندوپاسفیک) اشاره کرد (مجیدی نسب،۱۳۷۷).

پراکندگی جغرافیایی و محل زیست مهمترین گونه ها ی تجاری میگوهای پنئیده

۱-۱۰-۱ - میگوی سفید هندی *Fennero penaeus indicus*

مهمترین منطقه گسترش این میگو مناطق شمالی استرالیا، مناطق جنوبی گینه نو، سواحل غربی دریای چین جنوبی، خلیج سیام (تایلند)، مناطق شرقی جوامع اندونزی، مناطق شمالی و غربی جزایر مالزی، مناطق شرقی دریای آندامان، تمامی خلیج بنگال، دریای عربی، دریای عمان، خلیج فارس، دریای سرخ، سواحل شرقی قاره آفریقا، و اطراف جزایر ماداگاسکار است(Benzie, 2009). بدن این میگو شیری رنگ است تعداد خارهای بالایی روستروم آن ۹-۷ عدد و در پایین روستروم ۴-۳ عدد است. میگوی بسیار کم مقاومتی است و در پرورش و صید تلفات زیادی دارد. حداکثر طول درنرها ۱۸ سانتی متر و در ماده ها ۲۳ سانتی متر است (عابدیان، ۱۳۸۵) ، صید جهانی آن حدود ۱۵۰۰۰۰ تن است و پرورش آن در سال ۲۰۰۰ ، ۴۳۷۰ تن بوده است از این مقدار ۷۹/۵٪ مربوط به ویتنام، ۹/۹٪ عمان و ۶/۹٪ هند بوده است. در جه حرارت بهینه برای رشد ۲۳-۲۲ درجه سانتیگراد است (عمادی، ۱۳۸۴).

۲-۱۰-۱- میگوی موزی *Fenoro penaeus merguensis*

مهمترین منطقه گسترش این میگو ایندو پاسفیک غربی، از خلیج فارس تا تایلند، هنگ کنگ، فیلیپین ، اندونزی، گینهٔ جدید، اسکاندیناوی جدید، غرب، شرق و شمال استرالیا می باشد. رنگ بدن این گونه صورتی تا زردکم رنگ گاه سبز متمایل به خاکستری است که به نوع بستر و غذا بستگی دارد. علت نام گذاری به نام موزی این است که بدن میگو خالهای کوچکی دارد که شبیه موز است. از مناطق ساحلی تا عمق ۵۵ متری زندگی می کنند ولی بیشترین تراکم آن در عمق ۲۰ متری است. گله های بزرگی دارد که شب و روز در حال حرکتند. حداکثر طول نرها 19.5cm و ماده ها 24cm است. تعداد خارهای بالایی روستروم ۸-۷ تا و در پایین ۶-۵ تاست. بهترین درجه حرارت برای پرورش ۳۲-۲۵ درجه سانتیگراد و شوری مناسب۱۵-۳۲ ppt است (عابدیان، ۱۳۸۵). صید جهانی این گونه حدود ۸۰ هزار تن است. در سال ۲۰۰۰ پرورش جهانی آن ۴۵/۷۱۷ تن بوده است اندونزی ۶۰٪ تولید، ویتنام ۳۰/۴۲٪ و تایلند ۶/۶٪ تولید آن را شامل می شود (عمادی، ۱۳۸۴).

۳-۱۰-۱- میگوی ببری سبز *penaeus semisulcatus*

مهمترین منطقه گسترش این میگو ایندوپاسفیک غربی: از سواحل شرقی تا افریقا تا دریای سرخ ، خلیج فارس تا هند ، ژاپن ، تایلند، شمال استرالیا، سواحل مدیترانه شمال مصر، اسراییل و سوریه است. از مناطق ساحلی تا عمق ۱۳۰ متری پیدا می شود ولی بیشترین تراکم آن در عمق ۶۰متری است. گله های کوچکی دارند هم شب و هم روز می توان آنها را صید کرد.رنگ بدن این گونه سبز متمایل به خاکستری تا زیتونی است. روی بدنش باندهای رنگی اریبی وجود دارد و این رنگ آمیزی حتی روی روستروم نیز دیده می شود. فرمول روستروم آن در بالا ۸-۷ و در پایین ۳ عدد است. ولی از روی باندهای رنگی می توان میگوی سفید هندی را از میگوی ببری سبز تشخیص داد. حداکثر طول نرها۲۰ و ماده ها ۲۴ سانتی متر است (عابدیان، ۱۳۸۵).

۴-۱۰-۱- میگوی ژاپنی *Marsu penaeus japonicus*

مهمترین منطقه گسترش این میگو ایندوپاسفیک غربی، از شرق و جنوب شرق افریقا تا کره و ژاپن به طرف جنوب اندونزی، شمال و شمال شرق استرالیا به طرف غرب تا فیجی است، این گونه به دریای مدیترانه وارد شده و از طریق کانال سوئز به سواحل جنوبی ترکیه رسیده است. از مناطق ساحلی تا عمق ۹۰ متری زندگی می کنند و بسترهای ماسه ای یا گلی- ماسه ای را ترجیح می دهند رنگ بدنشان عمدتا قهوه ای روشن، قهوه ای متمایل به سبز با باندهای قهوه ای رنگ که بعضا ممکن است باندها از رنگ زمینه بدن روشن تر یا تیره تر باشد. طول نرها ۱۹ و ماده ها۲۲ سانتی متر است .فرمول روستروم آن در بالا ۱۰-۸ و در پایین ۲-۱ عدد است و روی روستروم نیز باندهای رنگی دارد (عابدیان، ۱۳۸۵). علیرغم این که اولین میگوی پرورش جهان است زیاد پروش داده نمی شود در سال ۱۹۹۱ میزان پرورش آن ۱۴۰۰۰ تن، درسال ۹۶، ۲۸۰۰ تن بوده و صید آن حدود ۱۲۰۰۰ تن است. درجه حرارت اپتیمم برای پرورش ۲۸-۱۸ درجه سانتیگراد و شوری بهینه ۳۵ تا۴۵ ppt است (عمادی، ۱۳۸۴).

۵-۱۰-۱- میگوی چینی *Fenoro penaeus chinensis* (*orientalis*)

مهمترین منطقه گسترش این میگو ایندوپاسفیک غربی، چین، هنگ کنگ و کره می باشد. در اعماق ۹۰ تا ۱۸۰ متری زندگی می کنند (عمادی، ۱۳۸۴).

۶-۱۰-۱ - میگوی ببری سیاه *Penaeus monodon*

مهمترین منطقه گسترش این میگو ایندوپاسفیک غربی ، شرق و جنوب شرقی افریقا و پاکستان تا ژاپن به طرف جنوب تا اندونزی و شمال استرالیا است. رنگ آن تیره و معمولا سیاه، شکم دارای باندهای اریب است و پیگمان های زیادی دارد. از سواحل تا عمق ۱۵۰ متری زندگی می کند ولی بیشترین تراکم آن در عمق ۶۰ متری است. بسترهای شنی و ماسه ای و مخلوطی از شن و ماسه و خرده صدف ها را دوست دارد در خورها و جنگلهای حرا

یافت می شوند. طول نرها تا ۲۶/۸ و ماده ها تا ۳۳/۷ سانتی متر می رسند در پرورش وزنشان تا ۱۵۰ گرم می رسد و در آب های دور تا ۶۰۰ گرم نیز صید می شوند، صید جهانی آن حدود ۶۰ هزار تن و پرورش آن در سال ۱۹۹۵ ، ۵۸۴ هزار تن و در سال ۲۰۰۰، ۵۷۲/۵ هزار تن بوده است از بین این مقدار تایلند ۵۱/۶٪، اندونزی۱۵/۸٪، و هند ۹/۲٪ و ویتنام ۹/۱٪ ، فیلیپین۷/۱٪، و مالزی ۲/۷٪ است. درجه حرارت اپتیمم برای پرورش ۳۴-۲۴ درجه سانتیگراد و شوری مناسب آن۲۵-۵ ppt است. با Gill net، Trawl و پره های ساحلی و انواع قفس آن را صید می کنند (عمادی، ۱۳۸۴). همانطوریکه در جدول ۲ مشاهده می شود مقایسه پارامترهای اقتصادی پرورش دو گونه میگوی *Peneaus vannami* و *Peneaus monodon* نشان می دهد که میگوی وانامی در پرورش سود آورتر است همچنین در نمودار ۲ مشاهده می شود که میزان پرورش این گونه از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۶ روند افزایشی داشته است.

۷-۱۰-۱- میگوی پا سفید غربی *Lito penaeus vanamei*

مهمترین منطقه گسترش این میگو ایندوپاسفیک شرقی: از شمال مکزیک تا جنوب و شمال پرو می باشد. این میگو از نوع میگوهای سرگردان است. تا سال ۲۰۰۲ دومین میگوی پرورشی بود. در سال ۲۰۰۲ تولید جهانی آن ۱۴۳/۷۳۷ تن بوده که از این میان ۳۴/۹٪ مربوط به اکوادور، ۲۳/۳٪ مکزیک، ۱۷/۴٪ برزیل، ۷/۹٪ کلمبیا، ۵/۷٪ ونزوئلا و ۳/۶٪ مربوط به نیکاراگوآست. زادگاه این میگو اطلس شرقی (ازمکزیک تا پرو) است. صید سالانه آن حدود ۲۳۳ تن و پرورش آن در سال ۱۹۸۸، ۷۵/۹۳۱ تن بوده است. روش پرورش به دوصورت متراکم و هم غیرمتراکم است. بهترین درجه حرارت برای پرورش این گونه ۳۳-۲۶ سانتی گراد و شوری مناسب ۳۵-۵ ppt است. در عرض ۵-۲ ماه، به ۷ تا۲۳ گرم می رسد. در سیستم پرورش غیرمتراکم۵۰۰ kg/ha ولی در سیستم متراکم، تا ۳ تن در هکتار یا بیشتر تولید خواهیم داشت. با توجه به مزایای پرورش میگوی سفید هندی نسبت به ببری سیاه (جدول ۲)، بسیاری از کشورها این گونه را در ردیف اول فهرست انواع پرورشی قرار داده اند(جدول ۳).

۲- مواد و روشها

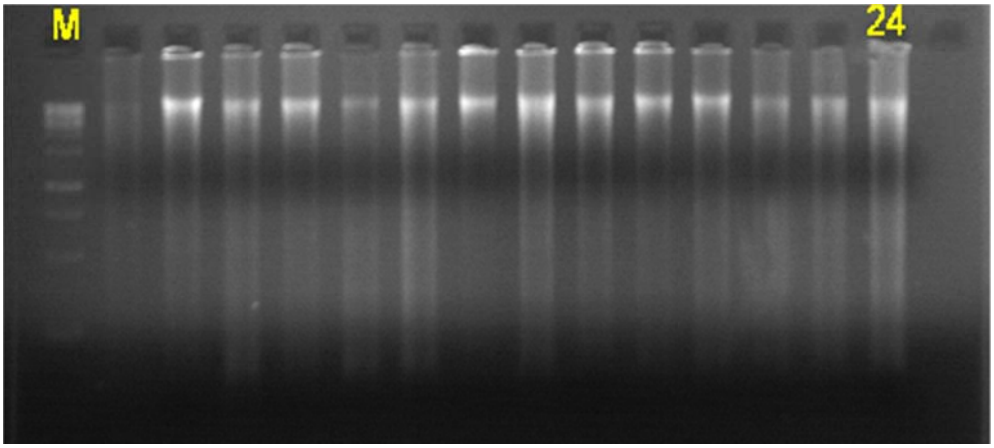
۲-۱- نمونه برداری

با توجه به پراکنش این گونه در خلیج فارس و دریای عمان انجام شد. در هر منطقه از ۵ قطعه میگو با استفاده از تور ترال نمونه برداری گردید. نمونه برداری از دو پای شنا انجام گرفته و در الکل ۹۶ درصد فیکس می گردند و به آزمایشگاه منتقل می شوند.

Species	N*	Site (area)	Labels
P. semisulcatus	۲	هرمز	۳۸،۳۹
P. semisulcatus	۲	جاسک	۴۵، ۴۳
P. monodon	۲	چابهار	۴۳، ۴۹
P. merguiensis	۲	هرمز	۴۵، ۴۳
P. indicus	۲	جاسک	۴۷، ۴۳

۲-۲ - استخراج Total DNA با استفاده از فنل – کلروفورم (تاگارت و همکاران۱، ۱۹۹۲)

استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم، استات آمونیوم و کیت انجام می گیرد. در این روش ابتدا ۵۰ mg از بافت عضلانی فیکس شده در اتانول خالص را در داخل تیوبهای ۱/۵ میلی لیتری بصورت خرد شده قرارداده و سپس بر روی آن مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از محلول Extract buffer ریخته و بدین ترتیب قطعات خرد شده، در این محلول بصورت معلق در می‌آیند. در مرحله بعد به مقدار ۶ میکرولیتر پروتئیناز K و ۲۰ میکرولیتر SDS ۲۰٪ (سدیم دودسیل سولفات) اضافه کرده و تیوپها در ترمومیکسر یا انکوباتور ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده می شوند. بعد از مرحله هضم سلولی با استفاده محلول فنل- کلروفورم، ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) و اتانول خالص اقدام به رسوب دادن DNA کرده و در نهایت رسوب سفید رنگی در ته لوله که همان Total DNA است جمع آوری می گردد. در مرحله بعد این رسوب با الکل ۷۰ درصد شستشو و سپس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده تا خشک شود. بعد از این مرحله بر روی رسوب به مقدار ۵۰ میکرولیتر از بافر TE اضافه می گردید.



وضعیت کیفی DNA استخراج شده در نمونه های مختلف از میگوی سفید هندی و میگوی موزی

۳-۲- اسپکتروفوتومتری

همانطور که قبلا اشاره شد ، جهت تعیین مقادیر DNA یا RNA از طریق استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر می بایست جذب نوری نمونه در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت شود. نسبت بین جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به جذب در طول موج ۲۸۰ نانومترشاخص کمیت DNA میباشد. این نسبت در مورد DNA استخراجی بین ۱/۸ تا ۲ محاسبه گردید. غلظت DNA استخراجی در نمونه های انجام شده بین ۱۷۰- ۱۵۰ نانوگرم در ماکرولیترمحاسبه گردید که پس از رقیق سازی از غلظت ۱۰۰ نانوگرم در ماکرولیترجهت انجام PCR استفاده گردید.

با توجه به نوع گونه مورد بررسی، بافت مورد توجه از بافت پای شنا جهت استخراج DNA استفاده گردید. روشهای زیادی جهت استخراج DNA در میگو استفاده میشود که مهمترین آن روش استخراج DNA به روش فنل کلروفرم می باشد که در این مطالعه از این روش استفاده گردید.(Tagart *et al*., 1999).

۴-۲- طراحی پرایمر

در این تحقیق جهت طراحی پرایمر ها (آغازگرها) توالی نوکلئوتیدی مربوط به ژن COI از طریق سرچ اینترنتی از بانک ژنی مشخص شد. بعد از مطالعات انجام شده بر روی توالی این ژن یک جفت پرایمر ۲۵ نکلئوتیدی به شرح زیر توسط شرکت ندای فن طراحی و ساخته شد.

COIP4 (5'-AGGAAATGTTGAGGGAAG AAATAA-3') (Tong *et al.*, 2000) and COIf (5'-TAA CCTGCAGGAGGAGGAG AYCC-3') of Palumbi *et al.*, (1991).

۵-۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR)

PCR دستگاه کپی کننده DNA است که از چند ماده ساده اولیه استفاده می‌کند. این مواد برای ساخت نسخه‌های بسیار زیاد از یک قطعه DNA خاص در لوله آزمایش بکار می‌رود. در PCR در یک سیستم بافری ساده، ناحیه‌ی خاصی از مولکول DNA الگو بوسیله یک DNA پلیمراز بدست آمده از باکتری گرما دوست به نام *Thermophilus aquaticus* ، تکثیر می‌شود و دی‌اکسی نوکلئوتیدها به عنوان بلوک‌های ساختمانی جهت ساخت رشته‌ی جدید استفاده می‌گردند. پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی اختصاصی نیز بر اساس قوانین کلی جفت شدن بازها به DNA الگو، متصل می‌شوند (یک پرایمر به رشته‌ی کدینگ و پرایمر دیگر به رشته‌ی غیرکدینگ هیبرید می‌شود). سپس، به دنبال چرخه‌های تکراری پلیمریزاسیون و واسرشت شدن، افزایش تصاعدی توالی تعیین شده توسط پرایمرها صورت می‌پذیرد. اساس PCR استفاده از دماهای مختلف در سه مرحله‌ی واکنش یعنی واسرشت شدن (Denaturation)، اتصال پرایمر (Annealing) و طویل شدن (Extension) می‌باشد (Pherson *et al.*, 2000).

▪ مواد لازم جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR)

- DNA الگو

با استفاده از روش های مذکور DNA استخراج شده از بافت ماهیچه ای به عنوان الگو جهت واکنشPCR استفاده می‌گردد. به طور معمول ۲-۱ ماکرولیتر از DNA استخراج شده به روش Chelex و یا روش NucleoSpinTissue Kit در حجم نهایی ۲۵ ماکرولیتر استفاده می‌شود.

- داکسی نوکلئوتیدهای تری‌فسفاته (dNTPs)

برای موفقیت PCR باید غلظت هر چهار dNTP (dCTP,dATP, dTTP, dGTP) برابر باشد، در غیر این صورت دقت PCR کاهش خواهد یافت. در اکثر موارد، غلظت dNTP ها باید در حدود ۲۰۰-۵۰ میکرومولار باشد. اگر غلظت بالاتر رود، دقت واکنش کم می شود زیرا *Taq* پلیمراز در این حالت بازهای اشتباه را به میزان بیشتر از حالت معمول وارد زنجیره می‌کند. در حالیکه اگر غلظت پایین‌تر باشد ممکن است بر بازده PCR تأثیر داشته باشد (Pherson *et al.*, 2000).

- کلرید منیزیوم ($MgCl_2$)

منیزیوم یکی از اساسی‌ترین اجزا PCR است، زیرا غلظت آن می‌تواند بر دقت و بازده واکنش تأثیر بگذارد. فعالیت *Taq* DNA پلیمراز به وجود یون منیزیوم وابسته است و بیشترین فعالیت خود را در محدوده غلظت mM ۱/۳-۱/۲ منیزیوم آزاد نشان می‌دهد. غلظت منیزیوم همچنین بر صحت (میزان اشتباه) DNA پلیمرازها اثر می-گذارد. در غلظت بالای منیزیوم نسبت به غلظت پایین آن، خطای *Taq* DNA پلیمراز افزایش می‌یابد و باعث

افزایش محصولات غیراختصاصی می‌شود، در صورتی‌که در غلظت‌های بسیار پایین، بازده واکنش کم خواهد شد. غلظت منیزیوم آزاد تحت تأثیر غلظت dNTP ها، پیروفسفات آزاد (PPi) و EDTA می‌باشد. اتصال مولی dNTP ها و Mg^{2+} به صورت یک به یک است (Pherson *.et al.*, 2000).

- **بافر PCR**

DNA پلیمرازهای مقاوم به حرارت معمولاً همراه یک بافر ۱۰X هستند. این بافر شامل ترکیبات زیر است:

- 100mM Tris-HCl (pH = ۸ در دمای ۲۵ °C)
- 500 mM KCl
- 15 mM $MgCl_2$
- ژلاتین 1 mg/ml
- 0.1% NP-40
- 1% Tween-20

که محلول بافر قبل از اضافه شدن شوینده‌های (Detergent) غیریونی NP-40 و Tween-20 باید اتوکلاو شود. در برخی روش‌های تهیه‌ی بافر، افزودن BSA (آلبومین سرم گاوی) را به میزان µg/ml ۵۰۰ توصیه می‌کنند. این بافر برای پایدار کردن آنزیم پلیمراز است.

Tris-HCl یک بافر یونی دوقطبی است که pH آن با دما تغییر می‌کند. در واقع *Taq* DNA پلیمراز در مقادیر pH پایین‌تر صحت عمل بیشتری خواهد داشت که این pH در دمای بالای PCR ایجاد می‌شود. KCl نیز می‌تواند به اتصال پرایمر/ الگو کمک کند. اگرچه در غلظت‌های بالا این عمل ممکن است بیش از حد مطلوب شده و باعث پایداری اتصال غیراختصاصی پرایمر به الگو و ایجاد محصولات ناخواسته گردد (Pherson *et al.*, 2000).

- **آنزیم *Taq* DNA Polymerase**

نوعی DNA پلیمراز وابسته به DNA مقاوم به حرارت است که اولین بار توسط Freeze Brock (1969) و از باکتری گرما دوست *Thermophilus aquaticus* به دست آمد. این آنزیم یک پلی‌پپتید ۹۴ کیلودالتونی است که دارای فعالیت ´۳ ´۵ DNA پلیمرازی است و برای فعالیت خود نیاز به یون منیزیوم دارد. سرعت ساخت DNA توسط آن ۶۰-۵۰ نوکلئوتید در ثانیه است که این سرعت معادل سرعت ۳ Kb /min در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد می‌باشد. این آنزیم نیمه عمری حدود ۴۰ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۹۵ دارد که معادل ۵۰ چرخه تحت شرایط عادی PCR می‌باشد. دمای بهینه فعالیت این آنزیم در حدود $^{\circ}C$ ۷۵- ۷۲ می باشد. با استفاده از این آنزیم می‌توان از دماهای بالا حتی $^{\circ}C$ ۷۰ در مرحله اتصال پرایمرها استفاده کرد، که این مزیت باعث دقت بیشتر در شناسایی توالی هدف توسط پرایمرها می‌گردد و توالی هدف به طور اختصاصی تکثیر می‌شود (Pherson *et al.*, 2000).

- پرایمرها یا آمپلی مرها

آغازگر ها برای پیش برد فرایند PCR به منظور افزایش تعداد نسخه های ناحیه خاصی از ژنوم طراحی می شوند. طراحی مناسب آغازگر از یک سو در عملکرد موفق و بهینه فرایند PCR و از سوی دیگر در پیشرفت مراحل بعدی بررسی های ژنتیک نظیر توالی یابی نقش به سزایی دارد (Surzycki, 2003).

واکنش PCR در ۵۰ ماکرولیتر محلول واکنش استاندارد انجام شد که شامل موارد زیر بود.۲ مایکرولیتر DNA ژنومی 1pmol از هر پرایمر، $MgcL_2$ 2.5 (از ۱/۵ تا ۳ چک شد). 2mm dNTP و۵۷ مایکرولیتر آنزیم Taq DNA پلیمراز که تکثیر ژن مورد نظر در دستگاه ترموسایکر PTC-200 انجام شد.

مراحل PCR	دما بر حسب درجه سانتی گراد	زمان
مرحله واسرشته سازی	۹۴	۴/۳۰
مرحله واسرشته سازی	۹۴	۱/۳۰دقیقه
مرحله اتصال آغازگرها به رشته الگو	۵۲-۵۶	۱ دقیقه
مرحله بسط	۷۲	۱ دقیقه
مرحله بسط نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه

۶-۲- ارزیابی محصول PCR

۱-۶-۲-الکتروفورز روی ژل آگارز

الکتروفورز روی ژل آگارز، متداول‌ترین و سریع‌ترین روش بررسی محصولات PCR می‌باشد. این روش، روشی استاندارد برای جدا کردن، شناسایی و تخلیص قطعات DNA و تکنیک ساده و سریعی است که قادر است قطعات DNA ای را که نمی توانند توسط روش‌های دیگر همچون سانتریفیوژ شیب چگالی از هم جدا شوند، از هم تفکیک کند. علاوه بر این مکان DNA درون ژل، مستقیماً از طریق رنگ‌آمیزی با غلظت‌های پایین رنگ فلوئورسانت اتیدیوم بروماید تعیین می‌شود. به کمک این ژل با غلظت‌های مختلف می‌توان قطعات DNA از ۲۰۰ جفت باز تا تقریباً ۲۰ کیلوباز را از هم جدا کرد. ژل آگارز به صورت افقی در میدان الکتریکی ثابت قرار می-گیرد (Sambrook and Russell, 1990).

۲-۶-۲- محلول‌های لازم جهت الکتروفورز روی ژل آگارز

- بافر TBE

این بافر در غلظت‌های ۵ برابر (5X) تهیه می‌گردد و در زمان استفاده، با آب مقطر رقیق می‌شود. معمولاً از غلظت ۱۰برابر آن (10X) کمتر استفاده می‌شود، چون بعد از گذشت چند روز رسوب می‌کند و به صورت

طولانی مدت نمی‌توان آن را نگه داشت. برای تهیه غلظت 5X این بافر، ۵۴ گرم Tris base با ۲۷/۵ گرم اسید بوریک در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده، ۲۰ میلی‌لیتر EDTA نیم مولار با pH ۸ به محلول اضافه می‌گردد. سپس این محلول با آب مقطر به حجم نهایی یک لیتر رسانده شده و تا زمان مصرف در دمای اتاق نگهداری می‌گردد. در هنگام الکتروفورز نمونه‌های DNA بر روی ژل آگارز از بافر TBE۰/۵X استفاده می‌شود. به منظور تهیه‌ی این بافر، TBE 5X به نسبت یک دهم رقیق می‌شود (۱۰۰ ml TBE 5X با ۹۰۰ ml آب مقطر مخلوط می-شود).

- ژل آگارز

در آزمایشات انجام شده در این پژوهش، از ژل‌های آگارز با درصدهای متفاوت استفاده شد. که در هر مورد با توجه به درصد ژل، میزان مورد نیاز از پودر آگارز با ۱۰۰میلی لیتر بافر TBE۰/۵X مخلوط شده، درب ظرف را شل کرده، ژل را در دستگاه microwave حرارت داده تا کاملاً حل شود.

- لودینگ بافر (Loading Buffer)

این بافر به دو منظور استفاده می‌شود: اول اینکه، به دلیل داشتن گلیسرول، چگالی نمونه را افزایش داده تا DNA سریع‌تر به ته چاهک رود. دوم، به دلیل اینکه محلول بهینه‌ی آن دارای دو رنگ بروموفنل‌بلو و زایلن سیانول است ، میزان حرکت نمونه‌ها به سمت آند را قابل پیش بینی می کند. این بافر معمولا به صورت محلولی با غلظت۶ برابر (6X) ساخته می‌شود و دارای Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار(pH =۶/۷)، ۰/۰۳٪ برومو فنل بلو، ۰/۰۳٪ زایلن سیانول، ۶۰ ٪ گلیسرول و EDTA ۶۰ میلی‌مولار می‌باشد (Sambrook and Russell, 1990). EDTA موجود در محلول به یون‌های فلزی دوظرفیتی (Divalent) متصل و نوکلئازهای وابسته به فلزات را مهار می‌کند.

- محلول اتیدیوم بروماید

مناسب‌ترین روش برای مشاهده‌ی DNA در ژل آگارز، رنگ‌آمیزی آن با رنگ فلوئورسانت اتیدیوم بروماید است. این رنگ حاوی گروه‌های سطحی (Planar) است که بین جفت بازهای DNA قرار گرفته و باعث می‌شود تا فلوئورسانت تشدید شده‌ای را نسبت به رنگ آزاد در محلول، در زیر نور ماوراءبنفش نشان دهد.

اتیدیوم بروماید معمولاً به صورت محلول ذخیره‌ای ۱۰mg/ml در آب تهیه شده و در دمای اتاق و ظروف تیره نگهداری می‌گردد. این رنگ معمولاً به ژل و بافر الکتروفورز در غلظت ۰/۵ µg/ml اضافه می‌شود. در پژوهش حاضر برای جلوگیری از آلودگی تانک و وسایل الکتروفورز ژل، بدون اتیدیوم بروماید اجرا شده و بعد از الکتروفورز کامل رنگ‌آمیزی می‌شود. در این مورد ژل در آب حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ µg/ml) به مدت ۳۰- ۲۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار می‌گیرد(Sambrook and Russell, 1990).

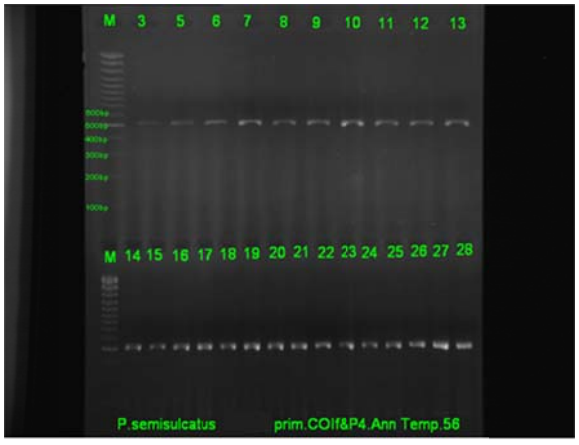
-روش کار

ژل آگارز ذوب شده به سینی حاوی شانه مخصوص تانک های الکتروفورز اضافه می‌شود. در موقع ریختن ژل در سینی باید توجه کرد که درون ژل و بین دندانه‌های شانه حباب تشکیل نشود.

بعد از بستن کامل ژل(حدود ۳۰ دقیقه در دمای اتاق)، با دقت شانه از ژل بیرون آورده شده و سینی حامل ژل در تانک الکتروفورز حاوی TBE۰/۵ X قرار داده می‌شود. نمونه‌های DNA مورد نظر(حدود ۳µl از DNA ژنومی یا محصولات PCR) با کمی لودینگ بافر مخلوط و با سمپلر مناسب به درون چاهک‌های ژل منتقل می‌شوند. سپس درب تانک بسته شده و الکترودهای تانک به منبع تغذیه وصل می‌شوند(شکل ۲-۴). این اتصال به گونه‌ای است که DNA به سمت آند مهاجرت خواهد کرد. به عبارتی قطب منفی، مجاور چاهک‌ها و قطب مثبت در سمت خلاف چاهک‌هاست. در این صورت DNA که دارای بار منفی است به سمت قطب مثبت حرکت خواهد کرد. ولتاژ مورد نیاز برای این الکتروفورز۱۰۰-۸۰ ولت است. زمان الکتروفورز نیز بر حسب در صد ژل و اندازه قطعات DNA متغیر است(Sambrook and Russell, 1990).

پس از اتمام زمان الکتروفورز، جریان قطع و درب تانک برداشته می‌شود. به دلیل اینکه درون ژل رنگ اتیدیوم بروماید اضافه نشده است، ژل از سینی ژل خارج و به مدت حدود ۲۰ دقیقه درون ظرف حاوی اتیدیوم بروماید قرار می‌گیرد. بعد از رنگ گرفتن، ژل به کمک دستگاه transilluminator که از خود نور ماوراءبنفش ساطع می-کند، مشاهده و سپس عکس آن تهیه می‌شود(Sambrook and Russell, 1990)

حال می توان از مطلوب بودن واکنش PCR و عدم تشکیل باندهای غیر اختصاصی مطمئن شد. در غیر این صورت واکنش باید مجدداً بهینه و تکرار گردد. در صورت نیاز همچنین می توان از روشهای تخلیص محصولات PCR استفاده کرد. در نهایت بهترین و شفاف ترین باندها انتخاب می‌شوند. نتایج حاصله تصاویر جهت آنالیز بصورت زیرمورد ارزیابی قرار گرفت.



۲-۷- تعیین توالی (Sequencing) مستقیم محصولات PCR

دو روش شیمیایی برای بررسی توالی DNA در دست است. روش خاتمه دی‌داکسی (ddNTP) که به وسیله Sanger ، Nickle و Coulson در سال 1977 میلادی ابداع شد (Pherson *et al.*, 2000) و روش شکست شیمیایی (Chemical cleavage) که توسط Gilbert and Maxam (1977) شد. روش دی‌داکسی متداولترین روش مورد استفاده می‌باشد. تعیین توالی DNA به این روش در واقع بر اساس وارد شدن ´۲ و ´۳ دی‌داکسی نوکلئوتیدها به عنوان خاتمه‌دهنده‌ها در زنجیره‌های DNA تازه ساخته شده می‌باشد. در واقع واکنش تعیین توالی DNA بر اساس ساخت یک رشته جدید DNA توسط یک DNA پلیمراز استوار می‌باشد که در محل اتصال یک پرایمر به مولکول DNA الگو تک‌رشته‌ای انجام می‌گیرد. به طور کلی در مورد محصولات PCR ، الگوی مورد استفاده دو رشته‌ای خواهد بود. لذا برای استفاده در واکنش تعیین توالی محصولات PCR حرارت داده می‌شوند تا دو رشته DNA از هم باز شوند و سریعاً از طریق قرار دادن در یخ خشک یا نیتروژن مایع، سرد می‌شوند، به طوریکه از اتصال مجدد رشته‌های جدا شده، جلوگیری شود. در این نوع تعیین توالی، که به صورت چهار واکنش مجزا(یک واکنش به ازا هر نوکلئوتید) انجام می‌گیرد، دی‌داکسی نوکلئوتیدهای تری‌فسفاته نیز وجود دارد. وارد شدن یک ddNTP به جای dNTP مربوطه باعث خاتمه‌ی سنتز زنجیره می‌شود، زیرا عدم وجود گروه OH – ´3 در ddNTP ها مانع از تشکیل پیوند فسفودی‌استر بعدی خواهد شد (Pherson *et al.*, 2000).

برای بررسی توالی محصولات بدست آمده، محصولاتی که باند خوبی تشکیل داده بودند برای تعیین توالی ارسال شد.

۲-۸- بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز *(Penaeus semisulcatus)* از دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز *I* به روش RFLP

نمونه ها از فاصله ۱۰ تا ۱۲ مایلی ساحلی در آبهای بوشهر به روش ترال کف، به تعداد ۳۵ میگو و نیز از منطقه هرمز در آبهای بندرعباس به تعداد ۴۰ میگو از گونه *P. semisulcatus* جمع‌آوری گردیدند. سپس تکه‌هایی از بافت‌های مختلف (آنتن‌ها، عضله، پریوپدها و پلیوپودها) در الکل خالص نگهداری گردید و نمونه‌ها برای انجام آزمایشات به رشت، انسیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری منتقل شدند.

DNA کامل که شامل DNA هسته و DNA سیتوپلاسمی (mtDNA) می‌باشد با استفاده از ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت و به روش فنول کلروفورم (Hillis & Moritz, 1990) استخراج گردید و ۳ تا ۴ میکرولیتر از DNA هر نمونه همراه با بافر LB در ژل آگارز یک درصد رانده شد و الکتروفورز گردید. بعد از مشاهده DNA با کیفیت مطلوب نمونه‌های DNA برای انجام آزمایشات بعدی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای ازدیاد قطعه ژن سیتوکروم اکسیداز I از یک جفت پرایمر استفاده شد که بر اساس اطلاعات بدست آمده از جستجو در اینترنت، از توالی ژن مذکور در گونه ببری سبز بوده که پرایمر فوروارد (۲۳ نوکلئوتید) با A و پرایمر

ریورس (۲۲ نوکلئوتید) با B طراحی و نامگذاری گردید. قطعه ژن سیتوکروم اکسیداز I تقریبا با همان روشی که توسط رضوانی گیل‌کلائی در سال ۱۹۹۷ شرح داده شده، با استفاده از DNAهای استخراج شده از نمونه‌ها، ۲۰ تا ۴۰ پیکومول پرایمر ساخته‌شده، dNTP، بافر آنزیم، آنزیم Taq، $Mgcl_2$ و آب مقطر که حجم محلول واکنش را به ۵۰ میکرولیتر می‌رساند، مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها پس از آماده سازی در دستگاه ترموسایکر با برنامه یک دوره به مدت ۴ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای Denaturation و در ادامه ۳۰ چرخه که یک دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد Denaturation و یک دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای پهلوگیری پرایمر جلودار در کنار DNA تک رشته‌ای شده (annealing) و همینطور یک دقیقه و سی ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای اجرای مرحله Extension و در نهایت با اضافه کردن یک سیکل اضافی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای Extension بیشتر قرار گرفتند. محصول PCR با اندازه‌های ۵۳۰ تا ۵۵۰ جفت باز با استفاده از ۹ آنزیم قطع‌کننده محدودالاثر، هضم گردیدند که آنزیم‌ها عبارتند از:

Alu, Hinf I, Hine II, Hpa II, Rsa I, Dde I, Hind III< Pvu II, Taq I

محصول واکنش آنزیمی حاوی مقدار ۰/۱ محصول PCR همراه با ۲ ماکرولیتر بافر آنزیم (۱۰ درصد حجم نهایی محلول واکنش) و ۰/۵ تا ۱ ماکرولیتر از آنزیم‌های مختلف (۵U تا ۱۰U) بنا به تصویه شرکت های سازنده و آب مقطر به اندازه‌ای که محلول را در تیوب ۱/۵ به ۲۰ ماکرولیتر برساند، بود. نمونه‌ها برای تمام آنزیم‌ها به‌جز برای آنزیم Taq I (که در ۶۵ درجا سانتی‌گراد اثر می‌کند) در ۳۷ درجه سانتیگراد بیش از یک ساعت انکوباسیون شدند.

محصول هضم‌شده قطعه ژن ازدیاد شده در گودیهای ژل پلی‌اکریلامید ۶ درصد قرار گرفتند و نمونه‌های برای مدت ۲/۵ تا ۳ ساعت با ولتاژ ۱۰۰ تا ۱۲۰ ولت رانده شدند و در نهایت با روش نیترات نقره رنگ‌امیزی شدند. باندهای DNA به وجود آمده پس زا هضم آنزیمی با استفاده از مارکر DNA (۵۰bp مارکر) اندازه‌گیری شدند و بر اساس اینکه هر نمونه دارای چه ژنوتیپی بوده با استفاده از حروف الفبای بزرگ A، B و ... هاپلوتایپ هر نمونه به صورت توالی از این حروف معین گردیدند. پس از تهیه جدول هاپلوتایپ نمونه‌ها، برای آنالیز آماری از نرم‌افزار Reap و برنامه مشابه سازی X^2 Monte-carlo simulation استفاده شد.

۳-نتایج

داده های بدست آمده بر اساس ژن COI نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا در بین گونه های مورد مطالعه است بطوریکه کمترین تنوع نوکلئوتیدی ۰/۱۳۶ (۱۳٪ درصد فاصله ژنتیکی) بین گونه های موزی و سفید هندی و بیشترین تنوع نوکلئوتیدی ۰/۲ (۲۰٪ درصد فاصله ژنتیکی) را بین گونه های موزی و ببری سبز ثبت کردیم.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. COI.Sem.38 IR															
2. COI.Sem.43 IR	0.002														
3. COI.Sem.45 IR	0.009	0.011													
4. COI.Sem.39 IR	0.009	0.011	0.000												
5. P.INDICUSCOI.AY395242	0.171	0.174	0.166	0.166											
6. COI.IN.IR.46	0.171	0.174	0.166	0.166	0.000										
7. COI.IN.IR.47	0.171	0.169	0.166	0.166	0.004	0.004									
8. MER.COIr AY143988	0.197	0.200	0.191	0.191	0.136	0.136	0.142								
9. COI.ME.IR.43	0.197	0.200	0.194	0.194	0.139	0.139	0.145	0.006							
10. COI.ME.IR.45	0.191	0.194	0.191	0.191	0.137	0.137	0.142	0.004	0.004						
11. COI.ME.IR.44	0.197	0.200	0.191	0.191	0.137	0.137	0.142	0.004	0.002	0.004					
12. COI.MO.IR.49	0.173	0.175	0.167	0.167	0.183	0.183	0.183	0.210	0.213	0.210	0.210				
13. COI.MO.PI.33	0.183	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185	0.207	0.208	0.211	0.211	0.102			
14. P.MON.COIr EF646172	0.163	0.166	0.157	0.157	0.171	0.171	0.171	0.201	0.204	0.202	0.202	0.013	0.107		
15. M.affinis.COI.AY264889	0.208	0.208	0.207	0.207	0.229	0.229	0.229	0.250	0.254	0.251	0.251	0.267	0.291	0.252	

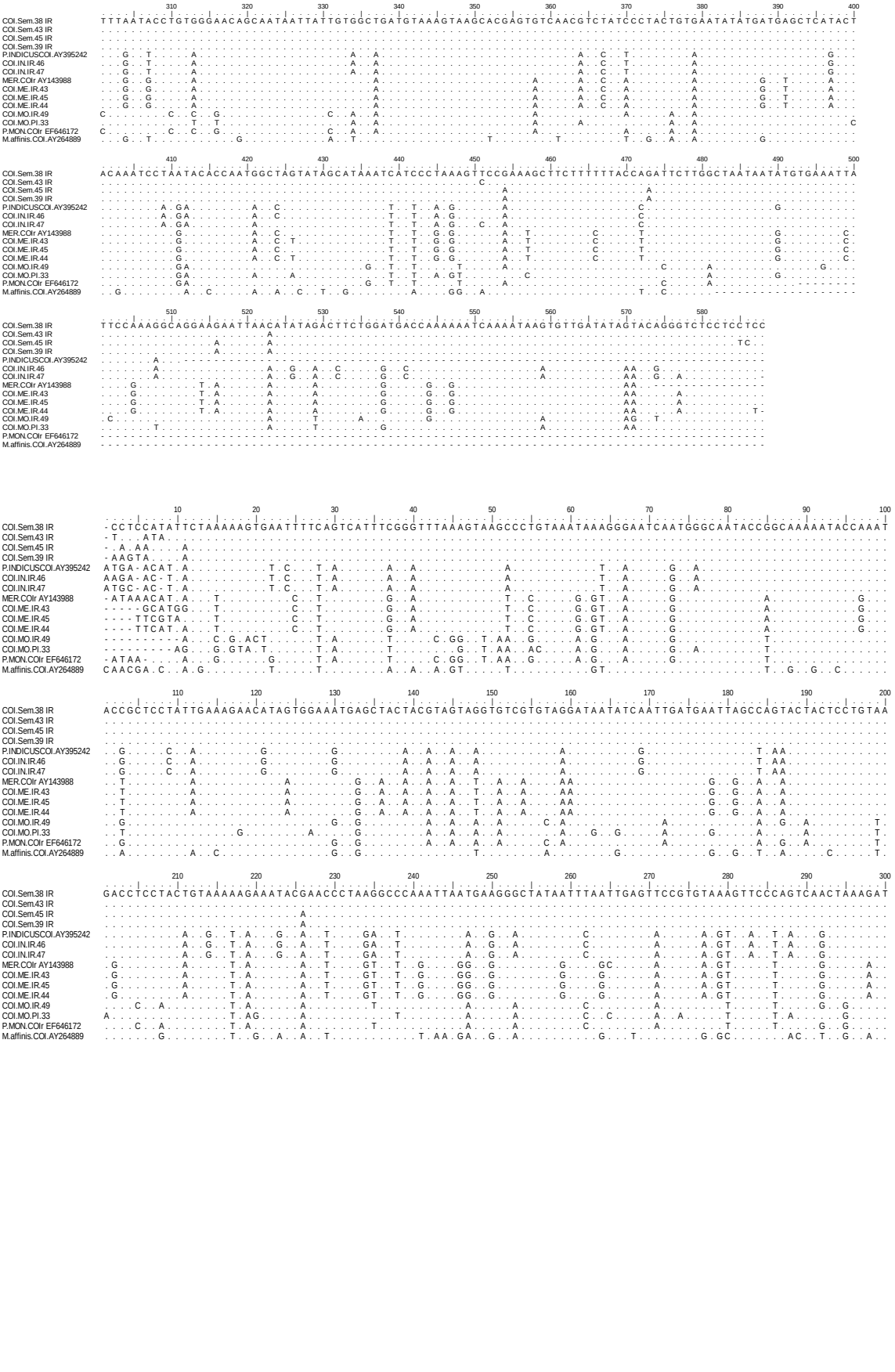
فاصله ژنتیکی بین مورفوتایپ‌های نواری و غیرنواری چهار گونه دیگر میگو. توالیCOI میتوکندریایی تاکسون *M. affinis* به عنوان outgroup در نظر گرفته شده است.

۳-۱- آنالیز داده ها و فیلوژنیک

الکتروفروگرام‌های تکی تصحیح شده و توالی ها با استفاده از نرم افزار Clustal 1.5c با تنظیم دستی هم‌عرض شدند. از نرم افزار PAUP ورژن 4.0b10 برای محاسبه فاصله ژنتیکی و رسم درخت فایلوژنی که میزان قرابت گونه‌های مورد نظر را ترسیم می‌نماید بر اساس مدل Kimura 2-parameter استفاده گردید.

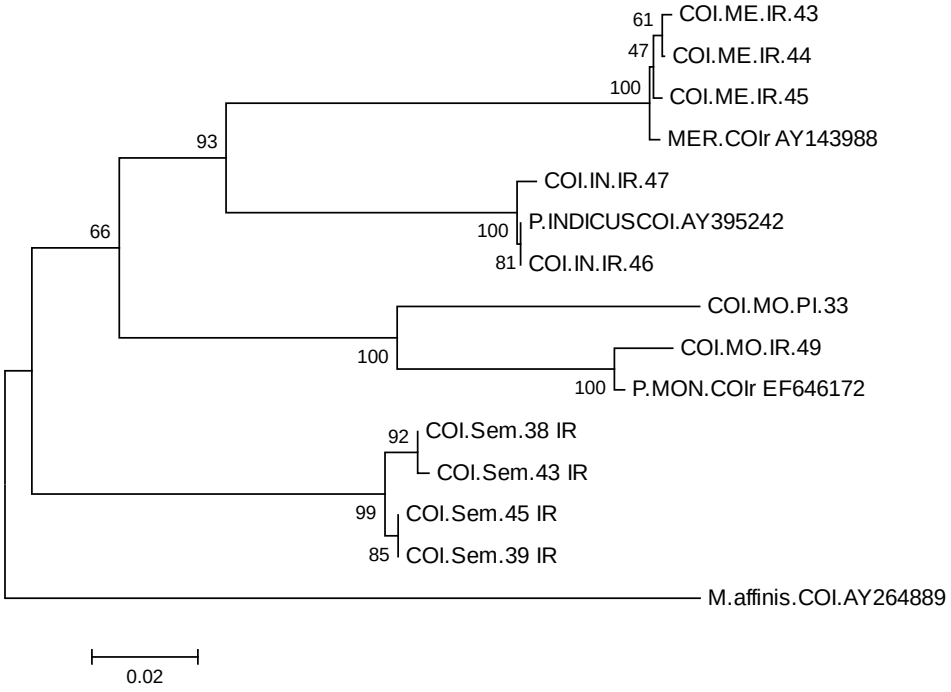
در این مطالعه تکثیر ژن که حاصل آن ۶۰۰ جفت باز بود در تمام نمونه ها آنالیز شد. توالی‌های هم‌عرض قرار گرفته در زمینه ای از ۵۸۸ جفت باز از توالی‌های مورد استفاده در ارزیابی ژنتیکی گونه‌های مورد نظر در شکل زیر نشان داده شده است.

Sequence alignment of partial COI gene of 15 taxa including *P. semisulcatus, P. merguiensi, P. indicus* and *P. monodon* from to Persian Gulf

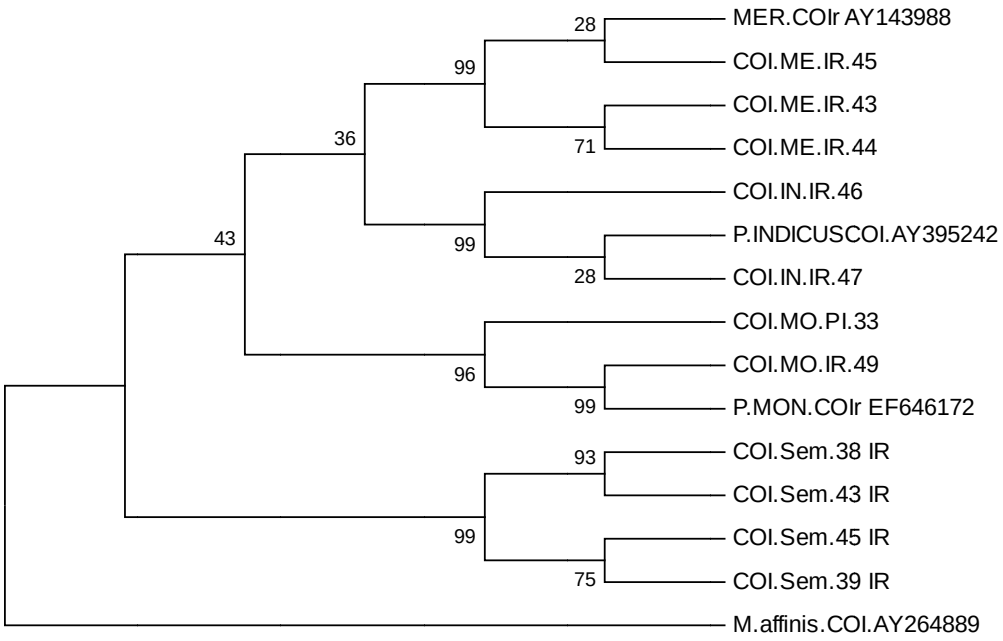


۲-۳- رسم درخت‌های فایلوژنی

رسم درخت‌های فایلوژنی Neighbor-Joining و Maximum Parsimony شکل مشابهی ارائه می کنند که بوضوح گونه های مورد مطالعه را در دسته‌های جداگانه قرار می‌دهد. نتایج بدست آمده نشان داد که همه۳هاپلوتیپ گونه موزی و همه۲هاپلوتیپ گونه سفید هندی در یک دسته جداگانه در ۲ گروه خواهری خوشه بندی شده اندو با گونه ببری سیاه تشکیل یک جد و نیای مشترک با تست Bootstrap بالا داده اند در حالیکه گونه ببری سبز تشکیل از ۳ گونه ذکر شده جدا و در یک کلاید متفاوت با فاصله زنتیکی بیشتری از سه گونه مورد بررسی فرار گرفته اند که نشاندهنده اختلاف ژنتیکی بالای این گونه نسبت به سه گونه مورد بررسی است. در این بررسی گونه سرتیز به عنوان outgroup جهت تایید اختلاف ژنتیکی بین گونه های مورد بحث استفاده شد.

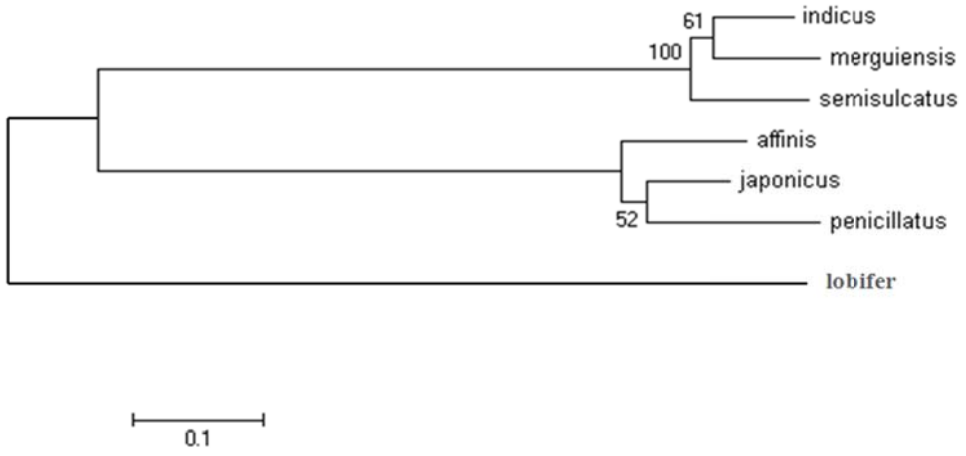


Neighbour joining tree based the partial COI gene sequences showing the relationships of *Penaeus* sp. *M. affinis* was used as outgroup.



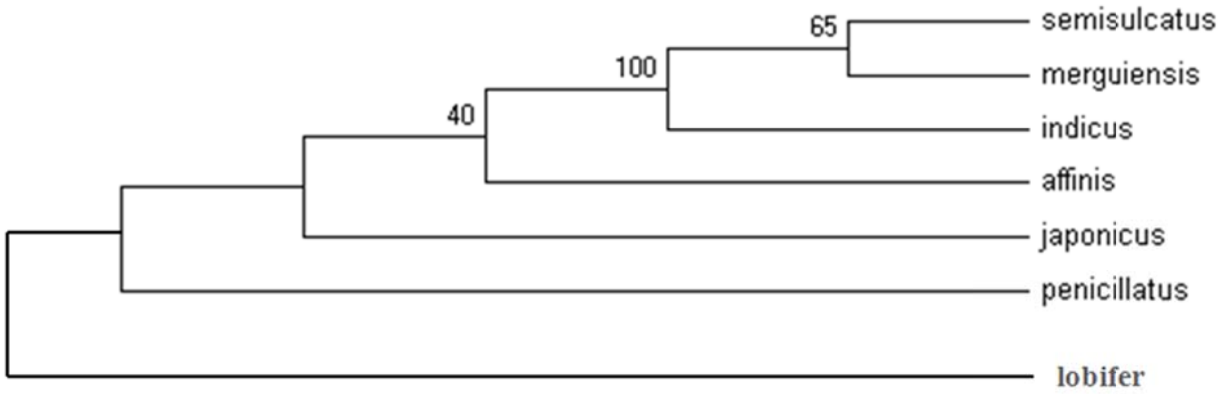
Maximum parsimony tree based on partial COI sequences showing the relationships between *Penaeus* sp.*M. affinis* was used as out group

نتایج حاصل از بررسی داده‌ها برای هر شش گونه با روش نزدیک‌ترین همسایه نشان می‌دهد که سه گونه *indicus* ، *merguiensis* و *semisulcatus* قرابت بالایی با هم داشته و در یک دسته به عنوان گونه‌های خواهری قابل دسته بندی هستند. همچنین سه گونه *affinis*، *japonicas* و *penicillatus* نیز نسبت به سایر گونه‌ها شباهت‌هایی دارند که به عنوان گونه‌های خواهری قابل تصور خواهند بود. در این بررسی توالی COI میتوکندریایی گونه *gammarus lobifer* به عنوان outgroup جهت تایید اختلاف ژنتیکی بین گونه های مورد بحث استفاده شد.



درخت فیلوژنی بر مبنای روش نزدیک‌ترین همسایه (N.J) برای ژن COI میتوکندریایی. توالی ژن COI گونه *gammarus lobifer* به عنوان Outgroup در نظر گرفته شده است.

این در حالی است که درخت حاصل از آنالیز ماکزیمم پارسیمونی هم گونه‌ها را به وضوح از هم تمیز داده است ولی آنها را در دو گروه خواهری دسته بندی نکرده و فقط روابط شامل اطلاعات حاصل از افتراق گونه‌ها از هم می‌باشد.



درخت فیلوژنی بر مبنای روش ماکزیمم پارسیمونی (M.P) برای ژن COI میتوکندریایی. توالی ژن COI گونه *gammarus lobifer* به عنوان Outgroup در نظر گرفته شده است.

۴-بحث و نتیجه گیری

فهم تاکسونومی گونه‌ها در برآورد تنوع زیستی و طراحی استراتژی‌های حفاظتی اهمیت دارد. گسترش فیلوژنتیک در نیمه دوم قرن ۲۱ در نتیجه پیشرفت سریع تکنیک‌های مولکولی و کاهش چشمگیر هزینه‌ها، استاندارد جدیدی را در زمینه تاکسونومی گونه‌ها ایجاد کرده است. در همین راستا استفاده از توالی‌های DNA جهت بازسازی فیلوژنتیک مورد استقبال عموم قرار گرفته است (Hou, 2007).

خط‌شناسه DNA (DNA Barcoding) ابزاری مناسب برای شناسایی و کشف بلقوه گونه‌های جدید است. در این مطالعه خط شناسه DNA توسط تعیین توالی ژن زیرواحد یک سیتوکروم اکسیداز میتوکندریایی (COI) به کار گرفته شد تا تنوع ژنتیکی جمعیت چهار گونه میگو با نام‌های *P. semisulcatus, P. merguiensi, P. indicus* and *P. monodon* که در آبهای خلیج فارس و دریای عمان ساکن هستند، مورد بررسی قرار گیرد.

ژن COI در حیوانات، منطقه کد کننده‌ی پلی پپتید بسیار حفاظت شده‌ای، در میتوکندری است (Walstenlolem, 1992) اما در بررسی‌های انجام شده روی سخت پوستان مانند: میگوهای Penaeid (Palumbi and Benzie, 1991) و نژادهای آرتمیا (Perez *et al.*,1994) نشان داده شده است که تنوعاتی در توالی نوکلئوتیدهای این ژن وجود دارد که قابل ملاحظه است. همانگونه که بیان شد از آنجا که COI میتوکندریایی مارکر مناسبی برای مطالعه و مشخص نمودن تمایزات ژنتیکی در سخت‌پوستان بوده است، به عنوان مارکر تمایزی در این مطالعه انتخاب شده است.

در این مطالعه برای اولین بار خط‌شناسه DNA این چهار گونه میگو مشخص شده است و اعتبار هرچه بیشتر این شیوه از مطالعه را برای شناسایی سخت پوستان دریایی به اثبات رسانید.

در این چهار گونه که به لحاظ مورفولوژی کاملا از هم متمایز شده‌اند، بررسی توالی COI میتوکندریایی نیز همان نتیجه را در بر داشت و اثبات می‌کند که افراد هر گونه در خوشه مربوط به خودشان به درستی جای گرفته‌اند. برای جلوگیری از هر گونه ابهام احتمالی در بررسی‌های انجام شده استانداردهای ارائه شده توسط Song و همکاران (2008) مد نظر قرار گرفت:

۱- هیچ stop-codon در توالی‌ها یافت نشد.

۲- تولید محصولات PCR و نیز تعیین توالی داه‌ها با کیفیت بسیار بالا انجام گرفت.

۳- توالی‌های COI در بانک ژن Blast شد تا از صحت آنها اطمینان کامل حاصل شود.

رسم درخت‌های فیلوژنتیکی در این مطالعه که بر پایه دو روش Neighbor-Joining و Maximum Parsimony انجام شده است و همچنین محاسبه فاصله ژنتیکی گونه‌ها نشان می‌دهد که گونه‌ها کاملا از هم تفکیک شده‌اند و این نتیجه با اطلاعات بدست آمده از بررسی‌های مورفولوژی کاملا مطابقت داشته و تأیید کننده آنها خواهد بود. تعیین کردن outgroup باعث افزایش صحت نتایج حاصله شده است (فاصله ژنتیکی داده‌های بدست آمده از outgroup با هر کدام از گونه‌های مورد بررسی بیش از ۰.۲ می‌باشد). آنچه که مسلم می‌باشد این نکته است

که شباهت‌ها و تفاوت‌های موجود بین این شش گونه مورد بررسی باعث شده که بتوان دو گروه خواهری برای آنها متصور شد. یک گروه خواهری که دربر دارنده سه گونه *indicus*، *merguiensis* و *semisulcatus* است و گروه دوم که سه گونه *affinis*، *japonicas* و *penicillatus* را در خود جای داده است. درخت ترسیم شده با روش نزدیک ترین همسایه نشان می‌دهد که با تعیین یک گونه به عنوان outgroup هر دو این گروه‌ها جد مشترکی با هم داشته و به در هر صورت از یک خانواده می‌باشند. جالب توجه اینکه در مطالعات انجام شده بر مبنای صفات مورفولوژیکی دو گونه *affinis*، *japonicas* در یک جنس با نام *Marsupenaeus* قرار داده می‌شوند و چهار گونه *indicus*، *merguiensis* ، *semisulcatus* و *penicillatus* متعلق به جنس *penaeus* هستند ولی در بررسی داده‌های حاصل از تعیین توالی ژن COI میتوکندریایی تقسیم‌بندی به نحو دیگری است و به نظر می‌رسد که گونه *penicillatus* قرابت‌های بیشتری با اعضای جنس *Marsupenaeus* دارد که این مطلب برای اثبات نیازمند مطالعات تکمیلی می‌باشد.

در مجموع، خط شناسه DNA ابزاری بسیار کارآمد برای شناسایی سخت‌پوستان به واسطه برقراری ارتباط بین نمونه‌های شناسایی نشده با گونه‌های شناسایی شده (تا جاییکه گونه‌های ثبت شده در بانک ژن قابل اتکا باشند) است. با وجود اینکه به داده‌های بیشتری از به اطلاعات حاصل از تعیین توالی COI برای توصیف گونه‌های جدید نیاز می‌باشد، خط شناسه DNA منجر به کشف گونه‌های مخفی (Cryptic) بیشتری خواهد شد. به هر حال با توجه به داده‌های بدست آمده از گونه‌های موجود در خلیج فارس و دریای عمان، احتمال ظهور گونه مخفی کم به نظر می‌رسد.

منابع

- محمدی کاشانی، ق. ۱۳۸۱. مطالعه جمعیتی شاه‌میگو گونه *Panulirus Homarus* با استفاده از آنالیزهای عددی و مولکولی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم جانوری، دانشگاه تهران.
- متین‌فر، ع.، ۱۳۷۸. بررسی و تعیین تنوع گونه‌ای و شناسایی جمعیت‌های میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) در آبهای شمالی خلیج فارس. پایان‌نامه دکترا دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۵۳ صفحه.
- Abdolhay, H. A. and Daud, Siti K., Rezavani Gilkolae, S. , Pourkazemi, M. , Siraj,Shapor., Abdul Satar and Mostafa Kamal (2010) Fingerling production and stock enhancement of Mahisefid (*Rutilus frisii kutum*) lessons for others in the south of Caspian Sea. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 13. pp. 177-185.
- Abdolhay, H. A. and Daud, Siti K., Rezavani Gilkolae, S. , Pourkazemi, M. , Siraj,Shapor., Abdul Satar and Mostafa Kamal.2010. Morphometrics studies of Mahisefid (*Rutilus frisii kutum*, Kamensky, 19010 from selrcted rivers in the southern Caspian Sea. Iranian Journal of fisheries sciences.9(1).1-18
- Argue, B. J., Arce, S. M., Lotz, J. M. and Moss, S. M. 2002. Selecive breeding of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. Aquaculture. 204: 447-460
- Bashirullah, A. K. M., Mahmood, N., Matin, A.K.M.A. 1989. Aquaculture and coastal zone management in Bangladesh. Coastal Manage, 17:119-127
- Benzie, J.A.J., Kenway, M., Trott, L., 1997. Estimates for the heritability of size in juvenile *penaeus monodon* prawn from half-sib mating. Aquaculture.152.: 49-53
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.Y., Grasshoff, P.M.1991. High resolution DNA amplification .fingerprinting using very short arbitary oligonucleotide primers. Bio/technology .9:553-557
- Carr, W. H., Fjalestad, K.T., Godin, D.M., Swingle, J., Sweeney, J.N., Gjedrem, T., 1997.Genetic variation in weight and servival in population of specific patogen free shrimp . *Penaeus vannamei*. In:Book of Abstracts. World Aquaculture, Bangkok, Thailand.:.63
- Chakmedoz, F., Pourkazemi, M., Zamini, A., Yarmohamadi, M., Rezvani Gilkolaei, S., Azizzade, L. 2009 Genetic analysis of spring and autumn races of Caspian Sea kutkm (*Rutilus frisii kutum*) using microsatellite markers Iranian Journal Of Animal Biosystematics .Vol.5, No.1.19-24
- Chow, S and Sandifer, P.A. 1991. Differences in growth, morphometeric traits and male sexual maturity among pacific white shrimp. Penaeus vannamei, from different commercial hatchares. Aquaculture. 92: 165-178.
- Cock, J., Gitterle, T., Salazar, M., Rye, M. 2009. Breeding for disease resistance of Penaeid shrimps. Aquaculture. 286. 1-11
- Emanifar, A, Rezvani Gilkolaei, S. 2006. Genetic differentiation of *Artemia uromiana* from various ecological population of Uromiana Lake assessed by PCR amplified RFLP analysis. Journal of Exprimental Marine Biology and Ecology.
- Emanifar, A., Rezvani Gilkolaei, S.,Karbutian, J.2006. Application of RFLP analysis to identify cyst populations of *Artemia uromiana* gunther. Crustaceana.
- Falconer, D. S.1998. Introduction to Quantitative Genetics. 3Th Edition. Longman Scientific& Technical. 438p.
- FAO, 1995. Statis of the shrimp and resources of Persian Gulf, No:668.
- Friars, G.W.1993.Breeding Atlantic salmon: A primer. Atlantic salmon Federation, St Andrews. NB. Canada, 13 pp.
- Garcia, D. K., Benzie, J.A. H. 1995. RAPD markers of potential use in penaeid prawn *(Penaeus monodon)* breeding programs. Aquaculture. 130 :137-144
- Gharibkhani, M. Pourkazemi, M. Soltani, S. RezvaniGilkolae and L. Azizzadeh . 2009.Population genetic structure of pikeperch (*Sander lucioperca Linnaeus, 1758*) in the southwest Caspian sea using microsatellite markers. Journal of fisheriesand Aquatic Sciences.4(3).161-168
- Gjedrem, T., 1992. Breeding plans for rainbow trout. Aquaculture. 100: 73-92
- Gjedrem, T., Fimland, E., 1995. Potential benefitts from high health and genetically improved shrimp stocks. In Browdy, C. L., Hopkins, J.S.,(Eds.). Proceedings of Special Session on Shrimp Farming Swimming Through Troubled Water. Aquaculture 95:235

- Golestani, N., Rezvani, S. Safari, R. Reyhani, S. 2010. Population genetic structure of the Silver Pomfret,Pampus argenteus (Euphrasen, 1788), Persian Gulf and the Sea of Oman as revealed by microsatellite variation. Zeology in the Middle East.49. 63-72.
- Goyard, E., Goarant, C., Ansquer, D., Brun, P., Decker, S.D., Dufour, R., Galinié, C., Peignon, J. M., Pham, D., Vourey, E., Harache, Y., Patrois, J. 2008. Cross breeding of different domesticated lines as a simple way for genetic improvement in small aquaculture industries: Heterosis and inbreeding effects on growth and survival rates of the Pacific blue shrimp Penaeus (*Litopenaeus stylirostris*). Aquaculture. 278: 43-50
- Hetzel, D.J. S., Crocos, P. J., Davis, G.P.,Moore and Preston, N.C.2000. Response to selection and hertability for growth in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture.181: 215-223.
- Goyard, E., Patrois, J. M.,Peignon, V., Vanaa, R., Dufour, J., Viallon and Bedier, E. 2002. Selection for better growth of *Penaeus stylirostris* in Tahiti and Caledonia. Aquaculture. 204: 461-468
- Hedgecock, D., Tracey, M. L. and Nelson, K. 1982. Genetics. In: L.G.Abele(Editor), The biology of Crustacea. AcademicPress, New York, pp: 284-403
- Hillis, D. M., Moritz, C. 1990. Molcular taxonomi. Sinauer associate, Inc. Publishers. Massachusetts
- Hou, Z. , Fu, J. , Li, S. , 2007. A molecular phylogeny of the genus *Gammarus* based on mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(2): 596-611.
- Kavan, L., Rezvani Gilkolae, S.Vossoghi, GH., Fatemi, S. M.R. , Safari, R. Jamili, S. 2009. Population genetic study *of Rutilus frisii kutum* (Kamanski, 1901) from the Caspian Sea , Iran and Azarbaijan regions using Microsatellite markers. Journal of fisheriesand Aquatic Sciences.1-8
- Lester, L.J ., Lawson, K. S., Abella, T. A.,Palada, M.S. 1989. Estimated heritability of sex ratio and sexual dimorphism in tilapia. Aquat. Anim. Health 10: 271-281
- Lester, L.J and Lauser, K. S., 1990. Inhertance of size as stimated by principal component analysis at two tempratures in *Penaeus vannamei*. Aquaculture.83:323-323
- Lightner, D. V. 2003. Exciusion or specific patogens for disease prevention in a penaeid shrimp biosecurity program. The world Aquaculture Society.Pp:81-116
- Moore, S.S ., Whan, V., Davis, G. P., Byrne, K., Hetzel, D. J.S. and Preston, N. 1999. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Aquaculture173: 19-32.
- Moss, D.R., Arce, S.M.., Otoshi, C.A., Doyle, R.W., Moss, S.M. 2007. Effect of inbreeding on survival ad growth of pacific white shrimp panaeus vannami . Aquaculture. 272S1: S30-S37.
- Naylor, R.L., Goldburg, R. J., Primavera, J.H., Kausky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effect of aquaculture on wild fish supplies. Nature 405: 1017-1024.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist. 106: 283-292.
- Nelson, K. and Hedgecock, D. 1980. Enzyme polymorphism and adaptive strategy in the decapod Crustacea.Am. Nat. 116:238-280.
- Palumbi, S.R. and J.A.H. Benzie. 1991. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar penaeid shrimp. *Molecular Marine Biology and Biotechnology.* 1: 27-34.
- Perez-Rostro , C.I., Ramirez, J. L and Ibarra, A.M. 1999. Maternal and cage effect on genetic parameter estimation for Pacific white shrimp *Penaeus (litopanaeus) vannamei* Boone.Aquaculture Research. 30:191-197.
- Perez, R., Glass, L., and Shlaer, R. J. 1994. Development of specificity in cat visual cortex. *Journal of Mathematical Biology*. 1:275-288.
- Pherson MM, Moller S. Moller SG. 2000. PCR (Basic: from background to bench). BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Preston, N.P., Brennan, D. C. and Croscos, P.J. 1999. Comparative costs of post larval production from wild or domesticated *Penaeus(Marsupenaeus) japonicus* (Beta) broodstock . Aquaculture Research (In press).
- Preston, N.P., Croscos, P.J. and Keys, S. J., Coman, G. J., Koenig, R.2004. Comparitive growth of selected and non-selected Kuruma shrimp *Penaeus(Marsupenaeus) japonicus* in commercial farm ponds; implications for broodstock production. Aquaculture. : 73-82.
- Preston, N.P., Croscos, P.J. and Keys, S.2002. Improving the growth rates of farm stocks of *Penaeus japonicus* through selective breeding, Aquaculture. 204. 239
- Pullin, R. S. V., Williams, M. J., Preston, N.1998. Domestication of crustacean, Asian Fish. Sci. 11: 71-80.
- Rezvani Gilkolaei, S. 2002. DNA PCR Amplification for Species Diagnosis of Caviar from Caspian Sea Sturgeon. JAST.4: 40-48.
- Rezvani Gilkolaei, S.,., Emanifar, A., Aqili, R., Laloei, F. 2006. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of *Rutius rutilus* Population on the southern coast of the Caspian Sea, Iran. Journal of marine Biology Association of the United Kingdom.86.1463-1467.

- Rezvani, S. Kavan, L., Safari, R. 2011. Study of genetic structure of *Rutilus frisii kutum* (Kamanski, 1901) in Anzali Lagoon using microsatellite. JAST. (IN PRESS)
- Rezvani, S., Safari, R., Laloei, F., Taqavi, M. J. 2010. Using RAPD markers potential to identify heritability for growth in Fenneropenaeus indicus. . Iranian Journal of fisheries sciences.10(1).123-134
- Safari, R., Pourkazemi, M., Rezvani Gilkolaei, S., Shabani, A., Bagherian Yazdi, A. 2008. Genetic relationships of Iranian coastline ship strgeon (*Acipenser nudiventris*) samples and Ural population based on microsatellite DNA. Iranian Journal of fisheries sciences.7 (2).229-241
- Sagi, A., Cohen, D., 1990. Growth, maturation and progeny of sex-reversed *Macrobrachium rosenbergii* males. World Aquacult. 21:4, 87-90
- Salari Aliabadi, M. A .,Razavani Gilkolaei, S; Savari, A; Zolgharnian, H. Nabavi, S.M.B. 2008. Population genetic structure of cobia , Rachycentron canadum revealed by microsatellite markers. 2(1).9-17
- Salari Aliabadi, M.A., Rezvani Gilklaei, S. Savari, A., Zolgharnain, H., Nabavi, S.M.B. 2008. Microsatellite polymorphism in Iranian population of Cobia, *Rachycentron canadum* . Biotechnology
- Sambrook J, Russell D. 1990. Molecular cloning. Laboratory Manual CSHL PRESS 2344.
- Song H, Buhay JE, Whiting MF, Crandall KA (2008) Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 105, 13486–13491.
- Surzycki S. 2003. Human Molecular Biology. Blackwell science Ltd
- Welsh, J.,Meclelland ,M.1990. Finger printing genomic using PCR with arbitary primers.Nucleic Acids Research.12:7212-7213
- Williams, J.G.K.,Kubelik, A., Livak, K.,Rasfolshki, J. A.,Tingey, S.V.1999. DNA polymorphism amplified by arbitary primers are useful and genetic markers.Nucleic Acid Res.18:6531-6535.
- Tianxiang, G., Jian, L., Qingyin, W. and Jinxian, L. 2003. Partial Sequence Analysis of Mitochondrial CO1 Gene of the Chinese Shrimp, Fenneropenaeus Chinensis. Journal of Ocean University of Qingdao (Oceanic and Coastal Sea Research). Vol.2, No.2, pp.167-170.
- Wolfus, G. M., Garcia, D. k and Alcivar-Warren, A.A. 1997. Application of the microsatellite technique for analysing genetic diversity in shrimp breeding programs., Aquaculture. 152: 35-47
- Yeh, F.C., Yang, R.C.and Boyle, T. 1999.Popgene. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Version 1.31
- Wolstenholme, D. R., 1992. Animal mitochomdrial DNA: structure and evolution. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 141: 173-216**.**
- (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean Sea. Mol. Ecol., 13:1785-1798.

Abstract:

Barcodes are short segments of DNA that can be used to uniquely identify an unknown specimen to species, particularly when diagnostic morphological features are absent. These sequences could offer a new forensic tool in plant and animal Conservation-especially for endangered species. It was proved that a small fragment of mitochondrial DNA from the 5′-end of cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene as a reliable, quick and cost-effective identification system for most Crustacea like shrimp. Take a look in DNA barcoding website show that there is a little data about Iranian shrimps which live in Persian Gulf and Oman Sea. In this Study six species of shrimp: *Fenoro penaeus indicus*, *Fenoro penaeus merguensis*, *penaeus semisulcatus*, *Metapenaeus affinis*, *Marsupenaeus japonicas, Fenoro penaeus penicillatus* were collected from different stations in Persian Gulf and Oman Sea. All materials were preserved in 70% ethanol and were shipped to the laboratory for taxonomic studies. After identification, the total DNA was extracted; CO*I* gene was first amplified and then sequenced for each species. Finally the collected data were analyzed with the specific phylogenetic software. The results were amazing and the interesting part was that analytical methods for showing species relationship suggested that *Fenoro penaeus penicillatus* is closer to *Marsupenaeus* gnus than *penaeus* gnus. This finding needs more investigation to be proved. We suggest a workflow for DNA barcoding, including database generation and management, which will ultimately be necessary if we are to succeed to join universal DNA barcode for Crustacea.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute

Project Title : Determining of DNA-Barcoding of 6 – 8 species by partial sequencing of mtDNA (CO1) **using molecular method (PCR-Sequencing)**
Approved Number: 14-12-12-9153-91001
Author: Sohrab Rezvani Gilkolaei
Project Researcher : Sohrab Rezvani Gilkolaei
Collaborator(s) *:* **A.Ghoroghi- N. Niamaimandi – S. Tomadoni Jahromi- Y.Moradi – M.A.Sistani – P.Mohabi Nozar. , GH. Skandari- N.Karami Rad- A.Fahim- F.Laloei – M.J. Taghavi – R.Abaspor naderi- H.Pourgholam**
Advisor(s): -
Supervisor: -
Location of execution : Tehran province
Date of Beginning : 2013
Period of execution : 1 Year
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2016

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute

Project Title :

Determining of DNA-Barcoding of 6 – 8 species by partial sequencing of mtDNA (CO1) using molecular method (PCR-Sequencing)

Project Researcher :

Sohrab Rezvani Gilkolaei

Register NO.

47664