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 – پژوهشکده میگوی کشور

عنوان:

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

مجری:
نصیر نیامیمندی

شماره ثبت
۵۰۴۱۳

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

عنوان پروژه : بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) از دریای عمان و خلیج فارس و با استفاده از ژن سیتوکرم اکسیداز به روش RFLP
شماره مصوب پروژه : ۹۱۰۰۳-۹۱۵۳-۱۲-۸۰-۱۴
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : نصیر نیامیمندی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : نصیر نیامیمندی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : سعید تمدنی جهرمی –همایون حسین زاده – محبعلی سیستانی – سید پرویز محبی نوذر- ناصر گرمی راد- احمد غرقی – محمدجواد تقوی – رضا عباسپور نادری – حمزه پورغلام – سهراب رضوانی گیل کلائی - غلام مرادی- فرامرز لالویی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان بوشهر
تاریخ شروع : ۹۱/۱۰/۱
مدت اجرا : ۹ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۵
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 : بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) از دریای عمان و خلیج فارس و با استفاده از ژن سیتوکرم اکسیداز به روش RFLP

کد مصوب : ۹۱۰۰۳-۹۱۵۳-۱۲-۸۰-۱۴

شماره ثبت (فروست) : ۵۰۴۱۳ تاریخ : ۹۵/۷/۱۳

با مسئولیت اجرایی جناب آقای نصیر نیامیمندی دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته بیولوژی و اکولوژی دریا می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بیولوژی و ارزیابی ذخایردر تاریخ ۹۵/۶/۶ مورد ارزیابی و با رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت مسئول تحقیقات زیستی در پژوهشکده میگوی کشور مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱

۱- مقدمه ۲

۲- کلیات ۴

۱-۲- ساختار ژنتیکی جمعیت آبزیان **..... ۴**

۲-۲-تارخچه روش بارکدینگ DNA..... ۴

۳-۲- دلایل استفاده از روش تاکسونومی مولکولی ۵

۳- مواد و روش ها ۷

۱-۳-نمونه برداری و ثبت نمونه ها ۷

۲-۳- استخراج DNA با استفاده از فنل کلروفرم ۸

۳-۳- اسپکتروفتومتری..... ۸

۴-۳- بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز *Penaeus semisulcatus* با استفاده از ژن سیتوکرم اکسیداز I به روش RFLP..... ۸

۴- نتایج ۱۰

۵- بحث و نتیجه گیری ۱۲

منابع ۱۶

چکیده انگلیسی ۱۷

چکیده

تحقیق حاضر طی سال های ۹۲-۱۳۹۱ در آبهای استان بوشهر انجام شده است. هدف این مطالعه تعیین خط شناسه DNA میگوی ببری سبز و ثبت توالی های بدست آمده در GenBank این گونه می باشد. در این تحقیق داده های مجموعه DNA استخراج شده بدست آمده سپس توالی ژن COI ابتدا تقویت شده و توالی آن تعیین گردید. در پایان داده های به دست آمده با نرم افزار پلی ژنتیک تجزیه و تحلیل گردید. آنالیز مولکولی نمونه ها تفاوت هایی را در گونه مورد بررسی در دو منطقه نشان میداد. همچنین جمعیت میگوی ببری سبز *Penaeus semisulcatus* دو منطقه با روش RFLP ژن COI و تعیین توالی 16SrRNA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان می‌دهند که ژن COI میتوکندریایی مارکر مناسبی برای تفکیک گونه های میگو می باشد که می تواند در مدیریت حفاظت از گونه های میگو کمک نماید.

کلید واژه ها: بررسی مولکولی، جمعیت، *Penaeus semisulcatus* ، خلیج فارس و دریای عمان

۱- مقدمه

میگوی ببری سبز از خانواده میگوهای پنائیده (Penaeidae) می باشد. این گونه در آبهای کشورهای عربستان سعودی، کویت، امارات و قطر نیز گونه اصلی به شمار می رود. در برخی از مناطق به آن میگوی صورتی می گویند. مناطق پراکنش این گونه در استان بوشهر، در آبهای مطاف (دیر)، تنگستان، شهرستان بوشهر و بحرکان می باشد. میگوی ببری سبز درصدی از صید میگو در آبهای خوزستان و هرمزگان را نیز در بر می گیرد. این گونه حدود ۵۰ درصد صید میگوی آبهای ایرانی خلیج فارس را شامل می شود (نیامیمندی، ۱۳۷۶). در برخی از گزارش ها ۸۰ درصد صید میگوی خلیج فارس را میگوی ببری سبز دانسته اند (Van Zalinge, 1984). ذخایر این گونه در آبهای استان بوشهر طی سال های اخیر نوسانات زیادی داشته که به دلیل صید بی رویه در فصول تخمریزی و تخریب زیستگاه های آن بوده است (Niamaimandi et al., 2007).

تخمریزی میگوی ببری سبز در آبهای عمیق و در بسترهای گلی انجام می گیرد (Rothlisberg and Jackson , 1987; Niamaimandi et al., 2008). گزارش شده که محیط زیست بالغین این گونه در دریای سرخ وسواحل سودان در بسترهائی است که ۷۰ درصد آن را گل و لای تشکیل می دهد (Branford ,1981). در آبهای خلیج فارس، آبهای کویت، گزارش شده که محل زیست میگوی ببری سبز مناطق گلی و نرم خلیج فارس می باشد. در آبهای بوشهر نیز میگوهای بالغ در مناطقی دیده شده اند که دارای بسترهای گلی بوده اند (نیامیمندی، ۱۳۸۵). در این منطقه (استان بوشهر)، میگوی ببری سبز دارای دو دوره تخمریزی در فصول پائیز و زمستان می باشد (Niamaimandi et al., 2008). فصل زمستان و اوائل بهار مهمترین دوره تخمریزی این گونه در منطقه یاد شده می باشد. پس از تخمریزی لاروهای این گونه مانند سایر گونه های پنائیده پس از مدت زمان کوتاهی از تخم بیرون آمده و بر روی آب به شکل شناور باقی می مانند. لاروها با جریانات دریایی و امواج به سواحل آمده و در همین زمان دوره های لاروی نیز طی می شود. در مرحله پست لارو و هنگامی که میگو قدرت شناگری دارد، میگوهای نوزاد وارد سواحل می شوند. این گروه از میگوها دارای عمر کوتاهی بوده و حداکثر طول عمر آنها ۲ تا ۳ سال می باشد. رشد آنها سریع و میزان باروری بالایی دارند. در میگوهای پنائیده ماده ها بزرگتر از نرها می باشند. در سنین پائین (کمتر از یک سال) به بلوغ جنسی رسیده و تخمریزی می کنند. لاروها بسیار کوچک بوده و پس از طی کردن مراحلی قدرت شناگری پیدا می کنند. در این زمان بسیار آسیب پذیرند و برخی از عوامل محیطی مانند بارندگی و درجه حرارت محیط در بقائ آنها تاثیر زیادی دارد.

بر اساس تحقیقات انجام شده عوامل محیطی نظیر بارندگی، شوری آب و درجه حرارت بر ذخایر میگوی ببری سبز تاثیر زیادی را نشان می دهد (Marcille, 1978; Jackson et al., 2001). لاروها در شوری و درجه حرارت های مختلف دیده شده اند. بر اساس گزارش های یاد شده شوری آب بر لاروها تاثیری ندارد ولی فراوانی لاروها در درجه حرارت های بالا کاهش می یابد. بارندگی نیز تاثیرات مهمی بر چرخه حیات و بقاء میگوهای پنائیده دارد. در آبهای ماداگاسکار در سالهای خشک صید میگو کمتر از سالهای بارانی بوده است (Marcille, 1978).

بارندگی بر تخمریزی میگوهای پنائیده، تاثیر می گذارد. در تحقیقی که انجام گرفته است مشاهده شده که تخمریزی میگوهای پنائیده در فصول خشک کمتر از فصول بارانی بوده است (Van Zalinge and Naamin, 1975).

تفکیک ژنتیکی جمعیت های آبزیان در سال های اخیر با روش های متعددی انجام شده است. در این خصوص گونه های میگوی پنائیده که دارای ارزش اقتصادی مهمی می باشند، در نقاط مختلف جهت بهره برداری بهینه مورد بررسی قرار گرفته اند. ژنتیک جمعیت های میگوی ببری سبز در خلیج فارس و برخی ازدیگر مناطق پراکنش این گونه انجام گردیده است. در یک گزارش از آبهای استرالیا دو جمعیت میگوی ببری سبز در مناطق شمالی و شرقی تشخیص داده شده است (Mully and Latter, 1980). بر اساس گزارش های موجود، در آبهای ژاپن(Taniguchi and Han, 1989) و چین (Tam and Chu, 1993) میگوی ببری سبز دارای یک جمعیت در این مناطق بوده است.

در آبهای ایرانی خلیج فارس و دریای عمان، با استفاده از روش RFLP، جمعیت های میگوی ببری سبز دریای عمان و خلیج فارس نیز متفاوت از هم بوده است ت(رضوانی و همکاران.، ۱۳۸۰). در منطقه خلیج فارس (آبهای استان بوشهر)، در تحقیق که با روش RFLP انجام شده است، گزارش شده که میگوی ببری سبز دارای یک جمعیت در این منطق می باشد (Niamaimandi et al., 2008) .

تحقیق حاضر جهت تعیین جمعیت های میگوی ببری سبز و با اهداف زیر انجام گرفت.

۱- تعیین جمعیت های میگوی ببری سبز در آبهای بوشهر و هرمزگان

۲- تعیین خط شناسه DNA میگوی ببری سبز

۳- ثبت توالی های بدست آمده در GenBank

۲- کلیات

۲-۱- ساختار ژنتیکی جمعیت آبزیان

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 مهره دارانی همانند ماهیها در محیط های دریایی می تواند به پایه ریزی علمی و صحیح برنامه های مدیریتی در بهره برداری بهینه از ذخایر دریایی کمک شایانی بنماید. ساختار ژنتیکی جمعیت موجودات دریایی می تواند تحت تاثیر عواملی مانند فاکتورهای فیزیکی دریا مثل جریانات اقیانوسی، جزر و مد و حتی تغییرات زمین شناختی قرار بگیرد. علاوه بر این فاکتورهای بیولوژیکی مثل پتانسیل جابجایی لاروها، استراتژی تولید مثل و پتانسیل مهاجرت گونه (عمودی و افقی) می تواند بر چگونگی پراکنش افراد جمعیت یک گونه تاثیر فراوان بگذارد.

۲-۲- تاریخچه روش های بارکدینگ و سکانس DNA

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 می کند.

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 ناحیه 648 نوکلئوتیدی در ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) میتوکندری می باشد که در سال های گذشته نشان داده شده است در شناسایی پرندگان، پروانه ها، ماهیان،حشرات ، انگلها و پارازیت ها 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 رده بندی پروکاریوتها و 18S rDNA هسته ای و 16S rDNA میتوکندری برای رده بندی یوکاریوتها استفاده شده است؛ کاربری این نشانگرها در یوکاریوتها برای تمایز گونه های مختلف رویه ای یکنواخت و استاندارد نداشته است .از این رو، یافتن نشانگری بهتر ضروری بوده است .هماکنون، برای شناسایی گونه های جانوران، ژن COI (زیر واحد 1 سیتوکروم اکسیداز) و همچنین سیتوکروم پذیرش عمومی پیدا کرده و کارایی مناسبی نشان داده اند.

برای گروه های دیگر مانند گیاهان، آغازیان و قارچ ها ترکیبی از توالی های دیگر به این منظور برگزیده شده اند (حاجی بابایی و همکاران، 2007). در سال ۲۰۰۳ محققین دانشگاه گولف در اونتاریو ، DNA بارکدینگ (خط شناسه گذاری DNA) را به عنوان یک روش برای شناسایی گونه ها و تعیین روابط بین آنها پیشنهاد کردند. بارکد

(خط شناسه DNA) توالی خاص حفاظت شده ای در موجودات مختلف می باشد که به صورت استاندارد مورد استفاده قرار می گیرد . 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. نتیجه کاربردی چنین مطالعاتی، ایجاد نشانگرهای ژنتیکی به منظور استفاده در مدیریت ذخائر ماهیان است.

۳-۲- دلایل استفاده از روش تاکسونومی مولکولی

اشتباه گرفتن تنوع درون گونه ای یا دوشکلی جنسی به جای تفاوت گونه ای، یکسان پنداشتن گونه های ظاهراً شبیه به هم، ناکارایی کلیدهای شناسایی برای مراحل پیش از بلوغ چرخه ی زندگی، نبود خصوصیات ریختی مشترک و قابل مقایسه در میان تاکسون های 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 جمله مواردی است که جهت استفاده از این روش گزارش شده است (هبرت و همکاران، ۲۰۰۳) . تاکسونومی مولکولی در پی جبران این کاستی ها با دو رویکرد دنبال می شود

۱- تعریف تاکسون های جدید یا بازآرایی تاکسون های شناخته شده بر پایه اطلاعات مولکولی

۲- به کارگیری داده های مولکولی برای نسبت دادن نمونه های جدید به گونه های تعریف شده از سوی تاکسونومیست ها می باشد.

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 روش های 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 25 سال

پیش شروع شده بود، تنها پس از کشف بارکدینگ،۲۵۰۰۰ بارکد را در قالب ۲۰۰۰ گونه، در عرض 3 سال شناسایی گردید (هبرت و همکاران، ۲۰۰۰ ؛ حاجی بابایی و همکاران،۲۰۰۷).

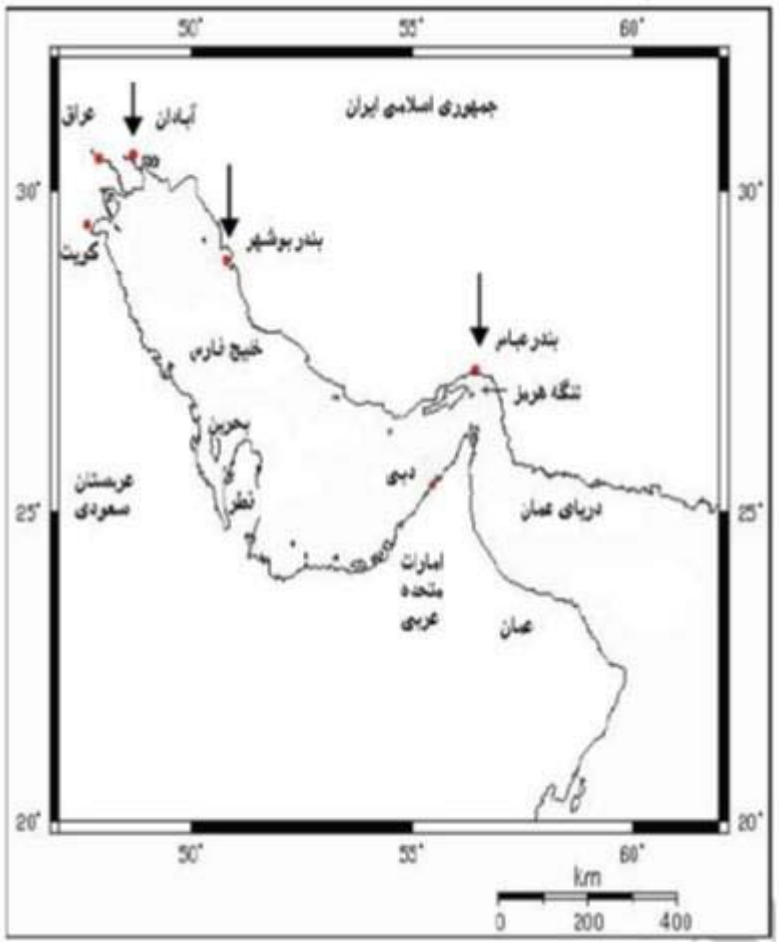
در بررسی های فیلوژنتیک، خط شناسه گذاری می تواند به انتخاب بهتر و درست تر تاکسون ها کمک کند. نشان داده شده است که افزودن گونه های بیشتر به یک آنالیز فیلوژنی ارزشمندتر از افزودن لکوس های بیشتر است. از سوی دیگر، داده های خط شناسه می تواند ارزیابی اولیه ای از مقدار تنوع درون جمعیت های مختلف در شرایط اکولوژیک 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، می توان داده های خط-شناسه را به داده های دیگر افزود، به ویژه که فرمت یکسانی برای گروه های بزرگی از جانداران دارد و امکان پژوهش های مقایسه ای را به خوبی فراهم میکند(حاجی بابایی و همکاران ،۲۰۰۷).

هم اکنون برای بدست آوردن تنوع ژنتیکی و پلی مورفیسم موجود در جمعیت به جای روشهای قدیمی مارکرها و ایزوآنزیم ها 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 (عشریون و همکاران، ۱۳۸۸).

۳- مواد و روش ها

۱-۳- نمونه برداری و ثبت نمونه ها

۳۰ عدد نمونه میگوی ببری سبز از دو منطقه آبهای خلیج فارس و دریای عمان جمع آوری گردید (شکل ۱). تکه هایی از بافت های مختلف(آنتن ها، عضله، پریوپدها و پلیوپودها) در الکل ۹۶ درصد نگهداری گردید و نمونه ها برای انجام آزمایشات به رشت، انسیتو تحقیقات بینالمللی ماهیان خاویاری منتقل شدند.



شکل ۱: منطقه مورد بررسی و نمونه برداری جمعیت های میگوی ببری سبز

با استفاده از کیت ها DNA استخراج شده و با استفاده از توالی های ژنهای مستقر در ژنوم mtDNA ثبت گردید. در GenBank پرایمرها طراحی و در دستگاه ترموسایکلر با بهینه سازی تعداد دور و مدت هر دور و سه دمای متعارف و محلول واکنش حاوی DNA و بافر وآنزیم Taq پلی مراز و پرایمرها و آب مقطر آزمایش PCR انجام شد. محصول PCR همراه با پرایمرها به خارج از کشور برای تعیین توالی ارسال گردید و با استفاده از نرم افزار های تخصصی مثل Mega 4,GenAlex و PopGene, ,تجزیه و تحلیل آماری صورت گرفت و جمعیت های احتمالی و شناسه های گونه معرفی گردید.

۲-۳- استخراج DNA با استفاده از فنل کلروفورم

استخراج DNA به روش فنل کلروفرم، استات آمونیوم و کیت انجام می گیرد .در این روش ابتدا - ۵۰ میلی گرم بصورت خرد شده / از بافت عضلانی فیکس شده در اتانول خالص را در داخل تیوب های 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 (سدیم دودسیل سولفات ۲۰ درصد) اضافه کرده و تیوپ ها در ترمومیکسر یا انکوباتور ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده می شوند . بعد از مرحله هضم سلولی با استفاده محلول فنل-کلروفورم، ایزوآمیل الکل و اتانول خالص اقدام به رسوب دادن DNAکرده و در نهایت رسوب سفید رنگی در ته لوله جمع آوری گردید. 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.

۳-۳- 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 می باشد. این نسبت در مورد DNA 1 تا 2 محاسبه گردید .غلظت / استخراجی بین DNA استخراجی در نمونه های ۱۵۰ نانوگرم در ماکرولیترمحاسبه گردید که پس از رقیق سازی از غلظت ۱۰۰ نانوگرم - انجام شده بین ۱۷۰در ماکرولیترجهت انجام PCR استفاده گردید (Tagart et al., 1999).

۴-۳- بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز I به روش RFLP

استخراج DNA با استفاده از ۵۰ تا ۱۰۰ میلی گرم از بافت و به روش فنول کلروفورم (Hillis & Moritz, 1990) انجام گرفت 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 نمونه های DNA برای انجام آزمایشات بعدی در ۲۰ درجه سانتی گراد 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 با استفاده از DNA های استخراج شده از نمونه ها، ۲۰ تا ۴۰ پیکومول پرایمر ساخته شده، PCR Buffer, MgCl2, dNTP, Taq, Primer F and R, DNA و آب است که حجم محلول واکنش را به ۵۰ میکرولیتر می رساند، مورد استفاده قرار گرفت .نمونه ها پس از آماده سازی در دستگاه ترموسایکر با برنامه یک دوره به مدت 4 دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد برای Denaturation و در ادامه ۳۰ چرخه که یک دقیقه در دمای

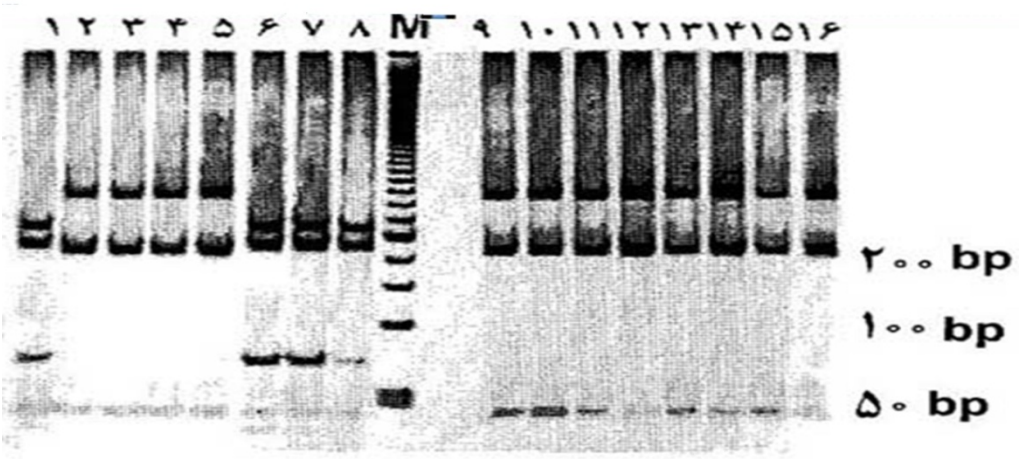
۹۵ درجه سانتی گراد Denaturation و ۱ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برای پهلوگیری پرایمر جلودار در کنارDNA تک رشته ای شده (annealing) و همینطور یک دقیقه و سی ثانیه در دمای 72 درجه سانتی گراد برای اجرای مرحله Extension و در نهایت با اضافه کردن یک سیکل اضافی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 72 درجه سانتی گراد برای Extension بیشتر قرار گرفتند.

محصول / محصول واکنش آنزیمی حاوی مقدار ۱/. محصول PCR همراه با 2 ماکرولیتر بافر آنزیم (۱۰ درصد حجم نهایی محلول واکنش) 1تا 1 ماکرولیتر از آنزیم های مختلف U۵ و U۱۰ بنا به تصویه شرکت های سازنده و آب مقطر به اندازهای که محلول را در تیوب۱/۵ به ۲۰ ماکرولیتر برساند. نمونه ها برای تمام آنزیم ها به جز برای آنزیم (Taq I که در 65 درجا سانتی گراد اثر میکند)در 37 درجه سانتی گراد بیش از یک ساعت انکوباسیون شدند.

محصول هضم شده قطعه ژن ازدیاد شده در گودی های ژل پلی اکریلامید 6 درصد قرار گرفتند و نمونه های ۲ تا 3ساعت با ولتاژ ۱۰۰ تا ۱۲۰ ولت رانده شدند و در نهایت با روش نیترات نقره / برای مدت 5 دقیقه رنگ امیزی شدند .باندهای DNA به وجود آمده پس از هضم آنزیمی با استفاده از مارکر DNA (bp۵۰) مارکر اندازه گیری 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 نمونه ها، برای آنالیز آماری از نرمافزار Reap و برنامه مشابه سازی Monte-carlo simulation X^2استفاده شد.

۴- نتایج

طول تقریبی قطعه تکثیر شده ۵۳۰ تا ۵۵۰ جفت باز بود که این اندازه در تمام نمونه ها مشابه نبوده است، به صورتی که ۲۹ نمونه از منطقه بندرعباس تقریبا ۵۵۰ جفت باز و ۱۰ نمونه از همین منطقه تقریبا ۵۳۰ جفت باز را نشان دادند. در حالیکه در تمام نمونه های بوشهر باندی را (محصول) PCR در اندازه ۵۳۰ جفت باز نشان دادند. اگرچه این تفاوت در ژلهای الکتروفورز محصول PCR خیلی مشهود نمی باشد اما بعد از هضم آنزیمی مشهودتر است (شکل ۱).



شکل ۱: الگوی هضم آنزیمی ژن سیتوکرم اکسیداز I با استفاده از آنزیم Alu 1. ستون های ۱ تا ۸ مربوط به نمونه های جمعیت میگوی ببری سبز هرمزگان و ۹ تا ۱۶ مربوط به منطق بوشهر و ستون M مربوط به مارکر (50 bp) می باشد.

پنج آنزیم محدودالاثر از ۹ آنزیم محدودالاثر استفاده شده(Rsa I, Alu I, Hinf I, Hine II, Hpa II)
الگوهای پلی مورفیسم یا چندشکلی را نشان دادند و سایر آنزیم ها دارای الگوهای مشابه در بین نمونه ها بودند. آنزیم RFLP حاضر ۵ هاپلوتایپ متفاوت (BBCBC, AAAAA, BBBBB, BBBBC, BBBBD) را در ۷۵ نمونه از میگوی ببری سبز متعلق به مناطق مورد مطالعه را نشان داد. دو هاپلوتایپ از ۵ هاپلوتایپ نشان داده شده دارای فراوانی یک بوده که این نوع را هاپلوتایپ نادر می نامند. هر دو مورد از این هاپلوتایپ ها متعلق به منطقه هرمز بودند و فقط یک هاپلوتایپ مشترک (AAAAA) از بین ۵ هاپلوتایپ بدست آمده بین دو جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱: فراوانی و درصد هاپلوتیپها در نمونه‌های مربوط به ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) هضم شده با آنزیمهای (Alu I ,Hinf I ,Hinc II ,Hpa II ,Rsa I) در بررسی جمعیت گونه *P. semisulcatus* موجود در منطقه هرمز و بوشهر

هاپلوتیپ	هرمز (دریای عمان)	درصد	هاپلوتیپ	بوشهر (خلیج‌فارس)	درصد
AAAAA	۱۱	۲۷/۵	AAAAA	۳۵	۱۰۰
BBBBB	۱	۲/۵	BBBBB	۰	۰
BBBBC	۲۴	۶۰	BBBBC	۰	۰
BBBBD	۳	۷/۵	BBBBD	۰	۰
BBCBC	۱	۲/۵	BBCBC	۰	۰
جمع	۴۰	۱۰۰	جمع	۳۵	۱۰۰

۵-بحث و نتیجه گیری

مشابه سازی سری های هاپلوتایپ تمام نمونه های بین دو جمعیت با استفاده از برنامه مشابه سازی - X^2 Monte arlo simulation انجام شد (Roff & Bentzen, 1989). تست X^2 اختلاف در پراکنش هاپلوتایپ ها بین دو منطقه مورد مطالعه را بالا و معنی دار($X^2 = 41.73$ $P> 0.00001$) نشان داد .بدین ترتیب ملاحظه می شود که تکرار هاپلوتایپ های mtDNA در دو منطقه مورد مطالعه با همدیگر تفاوت معنی دار دارند .تنوع هاپلوتایپ ها و نوکلئوتیدها (Diversity) و اختلاف آنها در بین دو منطقه مورد مطالعه بالا می باشد به شکلی که در جمعیت منطقه هرمز ۶۵۹۹ /۰±۰/۵۷۱۸ . میزان تنوع نوکلئوتیدها در منطقه هرمز ۰۶۹۱۴۳/. بود.

همچنین اختلاف نوکلئوتید بین جمعیت های میگوی ببری سبز منطقه هرمز و بوشهر در حدود ۸/۵ درصد واگرایی (Divergence) برآورد گردید. با فرض وجود ۲ درصد موتاسیون در هر یک میلیون سال در مولکول میتوکندریال DNA (Wilson et al., 1985) درصد جمعیت های میگوی ببری سبز خلیج فارس و دریای عمان با دارا بودن ۸/۵ درصد واگرایی به نظر میرسد حدود چهار میلیون و دویست و پنجاه سال قبل از هم جدا گردیده اند.

احتمالا به دلیل اینکه پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق از روی توالی ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) که توسط Baldwin و همکارانش در سال 1998 گزارش شده بود طراحی شده اند و در طراحی پرایمرها از ۸ جفت باز انتهایی رشته مذکور صرف نظر شده است، محصول PCR مورد انتظار میبایست تقریبا ۵۵۰ جفت باز باشد که در نمونه های جمع آوری شده از دریای عمان(بندرعباس) اندازه رشته ژن ازدیاد یافته در حد میزان قابل پیشبینی ۵۵۰ (جفت باز)بوده در حالیکه در نمونه های جمع آوری شده از بوشهر تقریبا دارای ۲۰ جفت باز کمتر می باشد که میتواند ناشی از پدیده حذف (Deletion) یا اضافه شدن (Insertion) توالی تعدادی از نوکلئوتیدها در طول رشته ژن باشد که نیاز به تعیین توالی کامل رشته های ژن مورد نظر در نمونه های دو منطقه خلیج فارس و دریای عمان باشد.

تجزیه و تحلیل RFLP حاضر روی ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) تکثیر شده با استفاده از تکنیکPCR تنوع بالای هاپلوتایپ ها و نوکلئوتیدها را در منطقه هرمز و تنوع پایین هاپلوتایپ ها و نوکلئوتیدها را در منطقه بوشهر نشان می دهد .به هر حال اختلاف نوکلئوتیدها مابین جمعیت های مورد مطالعه بالا می باشد. اگرچه تنوع ژنتیکی بین میگوهای متعلق به خانواده پنائیده به روش الکتروفورز آلوزایم میزان پایین تنوع را نشان داده است (Baldwin, et al., 1998)اما بررسی های ایزوزیم های پروتئینی اختلاف ژنتیکی را در میان ۷۸ گونه های میگوی مشابه از لحاظ مروفولوژیک در حد بالایی نشان داده است(Palumbi and Benzie, 1998) .

تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتیدها قطعه ۵۵۰ جفت باز متعلق به ژن سیتوکروم اکسیداز I(COI) اختلاف بالای ژنتیکی را بین ۱۳ گونه از میگوهی جنس *Penaeus* نشان داده که این یافته ها با کارهای قبلی که اختلاف ژنتیکی

بر اساس الکتروفورز آلوزیم ها بررسی شده بود و اختلاف ژنتیکیک را در جنس*Penaeus* خیلی پایین نشان داده بود، مغایرت دارد (Baldwin, et al., 1998).

نتایج بررسی جمعیت های میگوی *P. indicus* دو منطقه Cochin و Madras حاکی از اختلاف ژنوتی های mtDNA مابین جمعیت های این گونه در دو منطقه مورد مطالعه میباشد .در این مطالعه که با استفاده از تکنیک RFLP روی ژنوم میتوکندری انجام شده، از ۱۳ آنزیم محدود الاثر برای هضم آنزیمی ژنوم میتوکندری (۱۸۰۰۰ bp) استفاده شد .در نهایت حالت یکنواختی ژنوتیپهای حاصله با استفاده از ۱۰ آنزیم از ۱۳ آنزیم محدودالاثر مورد استفاده، گزارش گردید و حالت پلیمورفیسم فقط با استفاده از ۳ آنزیم باقی مانده از ۱۳ آنزیم مورد استفاده گزارش شد (Anitha et al.,1997).

وجود اختلافات بالای mtDNA بین بیشتر گونه های خانواده پنائیده با شباهت های مورفولوژیک بالا گزارش شده است. در سایرمطالعات انجام شده میزان اختلاف ژنتیکی زیر جنس *Litopenaeus* ۷/۴درصد گزارش شده است .در صورتیکه بین زیر جنس *Penaeus* این اختلاف در حدود ۱۸ درصد می باشد(Palumbi and Benzie, 1998) .

با وجود شباهت های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و اکولوژیک *P. stylirostris* و *L. vannamei* این دو گونه دارای اختلاف در نقاط خاموش ژنوم میتوکندری بوده و این اختلاف زیادتر از اختلاف بین انسان و شامپانزه یا گوسفند و بز می باشد. از این رو می توان نتیجه گرفت که تفاوت های بالای ژنتیکی بین گونه های میگو با تفاوتهای مورفولوژیک مطابقت نداشته و اختلاف بالای mtDNA بین بیشتر گونه های میگوی پنائیده با تشابهات مورفولوژیک بالا، حیرت انگیز می باشند. از این رو Palumbi و Benzie در سال 1998 دو نظریه برای تفاوتها در مسیر تکامل مولکولی و مورفولوژیک میگو ارائه دادهاند که عبارتند از:

1- میزان تکامل mtDNA ممکن است به سرعت افزایش یافته باشد.

۲- میزان بروز تفاوتهای مورفولوژیک در میگوها ممکن است به کندی صورت می پذیرد.

نتایج مطالعه حاضر نیز وجود اختلافات ژنتیکی بین نمونه های مربوط به گونه *P. semisulcatus* با تشابه مورفولوژیک در منطقه هرمزگان را نشان می دهد. همچنین وجود تفاوتهای ژنتیکی گونه *P. semisulcatus* در دو منطقه مورد مطالعه به اثبات رسید. بر اساس نتایج حاصل از این بررسی می توان چنین نتیجه گرفت که ذخایر میگوی *P. semisulcatus* در بوشهر(خلیج فارس) و منطقه هرمز(دریای عمان) دارای ساختار ژنتیکی متفاوتی می باشد. به طوریکه در بوشهر فقط یک هاپلوتایپ (AAAAA) با ۱۰۰ درصد فراوانی مشاهده گردید که هاپلوتایپ دیگر (BBCBC, BBBBD, BBBBC, BBBBB) فقط در منطقه هرمز مشاهده شدند و در منطقه بوشهر رویت نگردیدند. این امر بیانگر آن است که بخشی از میگوهای *P. semisulcatus* بین دو منطقه بوشهر و هرمز مهاجرت می کنند (هاپلوتایپ AAAAA) و به عبارت دیگر جریان ژنی بین دو جمعیت وجود دارد. ولی منطقه هرمز دارای میگوهایی است که ساختار ژنتیکی متفاوتی با منطقه بوشهر دارد و به ویژه هاپلوتایپ BBBBC با درصد فراوانی بالا (۶۰ درصد) می تواند به عنوان یک شاخص و مارکر ژنتیکی برای شناسایی میگوهای منطقه هرمز تلقی گردد.

با توجه به موارد اشاره شده همچنین میتوان نتیجه گیری نمود که هاپلوتایپ های BBBBB ، BBCBC و BBBBD از مشتقات هاپلوتایپ BBBBC می باشند که در اثر جهش تشکیل گردیده اند. مطالعات قبلی روی میگوی ببری سبز که از طریق بررسی های مورفومتریک مریستیک انجام گرفته بود، تفاوت میگوهای دو منطقه فوق را نشان می داد که تأیید نتایج حاصل از این بررسی است (متین فر، ۱۳۷۸).

از آنجایی که ۲۷/۵درصد نمونه های میگوی ببری سبز از منطقه هرمز از لحاظ ژنوتیپ مشابه با منطقه بوشهر بودند و طرح ژنوتیپی به دست آمده مربوط به دو منطقه مورد مطالعه، در بقیه موارد با همدیگر تفاوت داشته اند، می توان نتیجه گرفت،گروهی که از منطقه هرمز مشابه با گروه منطقه بوشهر می باشد به دلایلی مسیر حدفاصل این دو منطقه را طی کرده است که مؤید جریان ژنتیکی جمعیت های این دو منطقه می باشد. به دلیل نبود سد فیزیکی بین دو منطقه متفاوت این امر ممکن است اتفاق بیفتد و یا وجود جریان های آبی قوی در جهت عقربه ساعت ممکن است موجب جابجایی لاروها و سازگاری آنها در محیط جدید شود.

بنابراین گونه *P. semisulcatus* در آبهای خلیج فارس و دریای عمان دارای حداقل دو ساختار ژنتیکی متقاوت بوده و بطور معناداری این تفاوت نشان داده شده است. روش PCR-RFLP در این بررسی دارای کارایی بالایی بوده و علاوه بر قابلیت تمایز دو جمعیت جداگانه از میگوی ببری سبز، قادر بوده چند هاپلوتایپ را برای این دو منطقه مورد بحث، به طور اختصاصی معرفی نماید. پیشنهاد می شود این بررسی با جمع آوری نمونه های بیشتر از دیگر مناطق مانند خوزستان و چابهار نیز تکرار شود و با این روش سایر گونه های پراهمیت میگو مانند *Fenneropenaes indicus* و *F. merguiensis* نیز مورد بررسی و تحقیق قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران و مسئولینی که در نمونه برداری ها و کارهای آزمایشگاهی در این تحقیق به من یاری رساندند تشکر و قدردانی می گردد. آقایان دکتر آئین جمشید و دکتر مرتضوی ریاست محترم پژوهشکده میگوی کشور و پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، همکاران بخش ارزیابی ذخایر و آقای مهندس لالویی سپاسگزاری و تشکر می گردد.

منابع

- متین فر، 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 019 .صفحه.
- محمدی کاشانی، ق.،۱۳۸۱. مطالعه جمعیتی شاهمیگو گونه *Panulirus Homarus* با استفاده از آنالیزهای عددی و مولکولی .پایاننامه کارشناسی ارشد علوم جانوری، دانشگاه تهران.
- نیامیمندی، ن.، ۱۳۷۶. پویایی جمعیت میگوی ببری سبز در آبهای استان بوشهر. گزارش نهایی پروژه، موسسه تحقیقات شیلات ایران، صفحه ۱۱.
- نیامیمندی، ن.، ۱۳۸۵. چرخه حیات میگوی ببری سبز در حوضه آبهای ایرانی شمال خلیج فارس، فاز اول ، شناسایی مسیر مهاجرت و تعیین محل های تخمریزی و نوزادگاه، موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران، ۸۷ صفحه.

- Brandford, J R. 1981. Sediment and the distribution of Penaeid shrimp in the Sudanese Red Sea. *Estuarine coastal shelf science. No 13.* 349-354.
- Jackson, C.J., Rothlisbery, P.C and Pendrey, R.C. 2001. Role of larval distribution and abundance in overall life – history dynamics: a study of the prawn , *P. semisulcatus* Albatrass Bay, Gulf of carpentaria, Australia. *Mar.Ecol.Prog.Ser 213*. 241-252.
- Marcille, J. 1978. Daynamique des populatione de crevettes Penaeides exploitees a Madagascar. Life cycle, daynamics, exploitation and management of coastal Penaeid shrimp stock. 114-116.
- Mulley, J C and Latter, B D H. 1980. Genetic variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of penaed prawns. *Evolution* 34: 909-916.
- Niamaimandi, N., Aziz, A., Siti Khalijah, D., Che Roos, S. and Kiabi, B. 2007. Population dynamic of green tiger prawn, *P. semisulcatus* in Bushehr coastal waters, Persian Gulf. *Fisheries research* 86. 105-112.
- Niamaimandi, N., Aziz, A., Siti Khalijah, D., Che Roos, S. and Kiabi, B. 2008. Reproductive biology of the green tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) in coastal waters of Bushehr, Persian Gulf. – *ICES Journal of Marine Science*, 65: 1593–1599.
- 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.
- Roff, D. A., and P. Bentzen. 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: chi-square and the problem of small samples. Mol. Biol. Evol. 6:539-545.
- Rothlisberg, P C. and Jackson, C J. 1987. Larval ecology of Penaeids of the Gulf of Carpentaria, Australia. *Biology of Penaeid prawns in northern Australia*. 23-28.
- Taggart, J.B., Hynes, R.A., Prodohal, P.A., Ferguson, A., 1992. A simplified protocol for routin total DNA isolation from salmonid fishes. Journal of fish biology, 40:963-965.
- Tam, Y K. and Chu, K H. 1993. Electrophoretic study on the phylogenetic relationships of some species of *Penaeus* and *Metapenaeus* (Decapoda., Penaeidea) from the south China Sea. *Journal of Crustacean Biology* 13 (4): 697-705.
- Taniguchi, N. and Han, H. 1989. Population genetic analysis of fish and shellfish by isozymes. *Japanese Fisheries Resource Conservation Association Report:* 275-281.
- Van Zalinge, N P. and Naamin, N. 1975. The cilap based trawl fishery shrimp along the south coast of Java. *Penaeid shrimps-their biology and management*. 99-107.
- Van Zalinge, N.P. 1984. The shrimp fisheries in the Gulf between Iran and Arabian Peninsula. Penaeid shrimps-their biology and management. 71-78.
- Wilson, A.C., Rebecca. Cann,, S.M. Carrii., George, M., Gyllenstenis, U.B., Kathleen, G.M. Bychowski, B., Higuchi, R.G., Palumbilq, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D and Stoneking, M., 1985. Mitochondria1 DNA and two perspectives on evolutionary genetics . Biological journal of the Linnean Sociey, 26: 375-400.

Abstract
Goals: Determine of barcode of DNA in green tiger prawn, Penaeus semisulcatus, in the Gen bank of the species.
Material and methods: In these study 30 specimens of Penaeus semisulcatus from each region in the Persian Gulf and Sea of Oman were sampled and preserved in ethanol 96%. The total DNA was extracted, COI gene was first amplified and then sequenced for each species. Finally the collected data were analyzed with the specific phylogenetic software.
Result and discussion: Molecular analysis revealed some degree of interpopulation differences within two areas. Also for population study molecular data of species *Penaeus semisulcatus* were analysed base on COI RFLP and 16SrRNA sequences respectively. The results indicated that COI gen is a good marker for shrimp species differentiation that would be helpful to protect shrimp species.

Keywords: Genetic molecular, Population, Cytochrome oxidized COI, Persian Gulf and Oman Sea.

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

---

Project Title: Population genetic molecular study of *Penaeus semisulcatus* from Persian Gulf and Oman Sea by using of Cytochrome oxidized COI and RFLP method
Approved Number: 14-80-12-9153-91003
Author: Nassir Niamaimandi
Project Researcher : Nassir Niamaimandi
Collaborator(s): Rezvani Gilkolaei ,S., Moradi, Gh., Laloee, F., Tamadoni. S., Hossein zadeh. H., Sistani, M., Mohebi nozar, S.P., Garmi rad. N., Ghoroghi. A., Taghavi, M.J., Abbaspor naderi, R., Porgholam, H.
Advisor(s-
Supervisor: -
Location of execution: Bushehr province
Date of Beginning : 2013
Period of execution : 9 Months
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 -Shrimp Research Center

Project Title :

Population genetic molecular study of *Penaeus semisulcatus* from Persian Gulf and Oman Sea by using of Cytochrome oxidized COI and RFLP method

Project Researcher :

Nassir Niamaimandi

Register NO.

50413