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

عنوان:

ایجاد بانک اطلاعات ژنتیکی میگوهای پرورشی ایران

مجری:
وحید یگانه

شماره ثبت
۵۰۷۲۶

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

عنوان پروژه : ایجاد بانک اطلاعات ژنتیکی میگوهای پرورشی ایران
شماره مصوب پروژه : K۹۱۰۱-۹۱۰۰۳-۹۱۰۶-۱۲-۸۰-۱٤
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : وحید یگانه
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : وحید یگانه
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : محمد افشارنسب- مریم میربخش-سعید تمدنی- بابک قائدنیا- عقیل دشتیان-نسب- عیسی کشتکار- محمدعلی نظاری- مهرداد حسینی- فرخ انصاری -سهراب رضوانی - قاسم غریبی-عصمت محمدی باغملایی – شهلا جمیلی – محمد جواد شعبانی- کامبوزیاخورشیدیان – محمد خلیل پذیر
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : سید جواد حسینی- لاله پارسا یگانه
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان بوشهر
تاریخ شروع : ۹۱/۱۲/۱
مدت اجرا :۲ سال و ٤ 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 : **ایجاد بانک اطلاعات ژنتیکی میگوهای پرورشی ایران**

کد مصوب : 9101K -۹۱۰۰۳-۹۱۰۶-۱۲-۸۰-۱٤

شماره ثبت (فروست) : ۵۰۷۲٦ تاریخ : ۹۵/۹/۳

با مسئولیت اجرایی جناب آقای وحید یگانه دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته تکثیر و پرورش آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تاریخ ۹۵/۸/۳ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد□ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت کارشناس ارشد در پژوهشکده میگوی کشور مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۱-۱- تاریخچه تکثیر و پرورش میگو در جهان ۴
۱-۲- تاریخچه تکثیر و پرورش میگو در ایران ۵
۱-۳- تاریخچه تکثیر و پرورش میگو در استان بوشهر ۸
۱-۴- کلیاتی بر میگوی لیتوپنئوس وانامی ۹
۱-۵- میگوی ببری سبز ۱۱
۱-۶- میگوی سفید هندی *Fenneropenaeus indicus* ۱۲
۱-۷- میگوی موزی *Penaeus merguensis* ۱۳
۱-۸- تاریخچه و اهمیت DNA بارکدینگ ۱۴
۱-۸-۱- وضعیت DNA بارکدینگ در ایران ۱۶
۲- بررسی منابع ۱۹
۳- مواد و روش‌ها ۲۱
۳-۱- نمونه‌گیری ۲۱
۳-۲- استخراج DNA ۲۳
۳-۳- بررسی کمی و کیفی DNA ژنومی استخراج شده ۲۴
۳-۳-۱- الکتروفورز ۲۴
۳-۳-۲- اسپکتروفوتومتری ۲۵
۳-۴- انجام واکنش PCR ۲۵
۳-۵- تخلیص محصول PCR ۲۶
۳-۶-کنترل کیفی محصول PCR تخلیص شده ۲۶
۳-۷-کلونینگ ژن ۲۶
۳-۷-۱- انجام واکنش الحاق ۲۶
۳-۷-۲- تهیه سلول‌های مستعد ۲۷
۳-۷-۳- تهیه محیط کشت انتخابی ۲۸
۳-۷-۴- ترانسفورماسیون ۲۹
۳-۷-۵- غربال و کشت باکتری نوترکیب ۳۰

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۳-۸- استخراج پلاسمید ۳۱
۳-۹- هضم آنزیمی پلاسمید ۳۳
۳-۱۰- توالی یابی ۳۴
۳-۱۱- آنالیز بیوانفورماتیک ۳۴
۴-نتایج ۳۵
۴-۱- استخراج DNA ۳۵
۴-۲- تکثیر ژن سیتوکروم اکسیداز ۳۵
۴-۳- تخلیص محصول PCR ۳۶
۴-۴- کلونینگ ژن سیتوکروم اکسیداز ۳۶
۴-۵- استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی ۳۶
۴-۶- توالی یابی ۳۷
۴-۷- نتایج آنالیز شده بارکدهای DNA میگو ۳۸
۴-۸- نزدیک‌ترین نمونه‌های شناخته شده از لحاظ تشابه مولکولی ۵۶
۴-۹- محاسبه فواصل ژنتیکی ۵۷
۴-۱۰- درخت فیلوژنتیک ۵۸
۵-بحث و نتیجه گیری ۶۰
منابع ۶۲
چکیده انگلیسی ۶۴

چکیده

خط شناسه DNA و یا بارکد–DNA یک توالی بسیار کوتاه استاندارد از یک ژن کاملاً شناخته شده سیتوکروم اکسیداز–۱ میتوکندریایی است. به کمک این توالی DNA می‌توان پی برد که هر جانور، گیاه یا قارچ به چه گونه‌ای تعلق دارد. در این پژوهش از میگوی پرورشی وارداتی *Litopenaeus vannamei* و۵ گونه میگوی خلیج فارس و دریای عمان که بر اساس طبقه بندی سیستماتیک سنتی عبارت بودند از: *Penaeus semisulcatus*، *Fenneropenaeus merguiensis*، *Metapenaeus affinis*، *Parapenaeopsis Stylifera* و *Fenneropenaeus indicus* نمونه برداری شد و پس از انجام آزمایشات مولکولی بر روی توالی بارکدDNA ، عملیات بیوانفورماتیکی و آنالیز بارکد هر توالی در نرم افزار کنسرسیوم خط شناسه گذاری (CBOL) و پایگاه داده های بانک جهانی ژن(NCBI) ، طبقه بندی فیلوژنتیک هر نمونه مشخص گردید و میزان تشابه هر نمونه با پایگاه داده هایNCBI و CBOL بررسی و نزدیک ترین گونه به نمونه مورد بررسی تعیین شد. نتایج نشان دادند که نمونه های L.vannamei گونه باندار *P. semisulcatus*، *F . merguiensis* و *F. indicus* با نمونه های سایر کشورها بیش از ۹۷ درصد مشابهت داشتند. گونه بدون باند P.semisulcatus 09/87 درصد مشابهت با گونه *P.semisulcatus* باند دار، نمونه *M. affinis* بیش از ۹۰/۳درصد شباهت با *Metapenaeus ensis* و نمونه ۹۳/۴۴ درصد *Parap. Stylifera* مشابهت با *Parapenaeopsis coromandelica* داشت که در رابطه با گونه هایی که درصد مشابهت کمتر از ۹۷ درصد می باشد نیاز به بررسی های بیشتر و در صورت تایید امکان اعلام گونه جدید وجود دارد.

کلمات کلیدی: خط شناسه DNA، میگو، سفید غربی، ببری سبز، موزی، خنجری، سرتیز، سفید هندی

۱-مقدمه

امروزه منابع عظیم آبی، علاوه بر تأمین بخشی از نیاز غذائی کشورهای پیشرفته، ازنظر اقتصادی و سیاسی نیز اهمیت ویژه‌ای یافته است. کشور پهناور ایران با حدود ۲۷۹۲ کیلومتر مرز آبی در جنوب و شمال جزء معدود کشورهایی است که از این نعمت سرشار الهی برخوردار است. دریای عمان و خلیج‌فارس این آبراه سرشار از مواهب خدادادی، با مساحتی حدود ۲۳۹۰۰۰ کیلومتر مرز آبی حدود ۱۸۰۰ کیلومتر از دماغه گواتر آغاز و تا اروندرود ادامه یافته است. آب رودخانه‌های دجله و فرات و کارون به آن می‌ریزد و عمق سواحل آن از ۲۰ متر تجاوز نمی‌کند و از اهمیت ویژه‌ای جهت صید میگو برخوردار است. غذا و تغذیه بی‌گمان شایان‌ترین موضوع مورد بحث در قرن حاضر است. افزایش روزافزون جمعیت از یک‌سو و محدود بودن منابع غذایی از سوی دیگر باعث شده است که کوشش گسترده‌ای در راستای تأمین غذا صورت گیرد. در این میان تغذیه از آبزیان به دلیل نقشی که در سلامتی انسان‌ها دارا می‌باشند نقش ویژه‌ای در سبد غذائی پیدا کرده است. در میان آبزیان میگو به دلیل دارا بودن عناصر باارزش و کارآمد در رشد و سلامت انسان‌ها از اهمیت خاصی بر خوردار است.

پرورش میگو به‌عنوان یکی از فعالیت‌های مهم آبزی‌پروری در جهان و ایران در حال توسعه و گسترش است. در کشور ما با توجه به گستردگی سواحل جنوبی و گسترش سریع صنعت و پرورش میگو در طول این مناطق با توجه به تحقیق، بررسی و مطالعه در این زمینه از شاخص‌ترین رسالت‌های محققین مرتبط با امر

تکثیر و پرورش میگو است. استفاده از گونه‌های غیربومی به‌منظور افزایش تولیدات غذایی در سطح جهان، پراکنده شده است که ازجمله می‌توان به پرورش *لیتوپنئوس وانامی*[۶] اشاره نمود. این میگو با نام علمی *لیتوپنئوس وانامی* و نام عمومی سفید غربی[۷] به‌طور طبیعی در سواحل دریای مکزیک، مرکز و جنوب امریکا و جنوب پرو یافت می‌شود.

تولید آبزیان از دو منبع آبزی‌پروری و صید در ۵ دهه اخیر به‌صورت مستمر افزایش یافته و در سال ۲۰۱۲ به رقم ۱۵۸ میلیون تن رسید. نرخ افزایش تولید آبزیان برای مصرف انسانی در ۵ دهه گذشته به‌طور متوسط معادل ۳.۲٪ بوده که دو برابر نرخ افزایش جمعیت جهانی در همین زمان ۱.۶٪ بوده و این حاکی از میانگین افزایش مصرف سرانه آبزیان در جهان بوده است. مصرف سرانه آبزیان از مقدار ۹.۹ کیلوگرم در دهه ۱۹۶۰ به بیش از ۱۹.۲ کیلوگرم در سال ۲۰۱۲ رسیده است که نمایانگر استقبال عمومی جهان از افزایش مصرف آبزیان است.

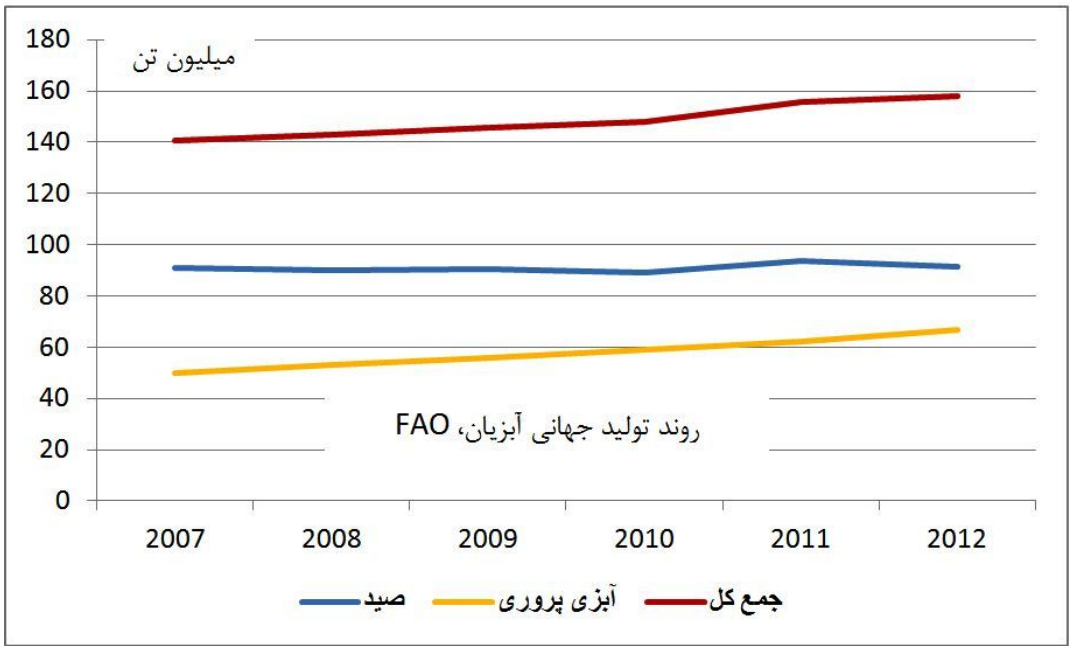
روند افزایش تولید آبزیان از طریق آبزی‌پروری همچنان ادامه دارد ولی از شدت رشد آن کمی کاسته شده است. بر اساس آمار سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد تولید آبزیان از طریق آبزی‌پروری با احتساب گیاهان دریایی ۹۰.۴ میلیون تن بوده که معادل ۱۴۴.۴ میلیارد دلار آمریکا است .این مقدار تولید شامل ۶۶.۶ میلیون تن مصرف مستقیم انسانی معادل ۱۳۷.۷ میلیارد دلار و ۲۳.۸ میلیون تن گیاهان دریایی معادل ۶.۴ میلیارد دلار است.

---

[6] - *Litopenaeus vannamei*

[7] - White shrimp

علاوه بر آن مقدار ۲۲۴۰۰ تن معادل ۲۲۲.۴ میلیون دلار نیز آبزیان غیرخوراکی تولید شده است. سهم آبزی‌پروری در سال ۲۰۱۲ از کل تولید ۱۵۸ میلیون تن آبزیان (صید و آبزی‌پروری) به ۴۲.۲٪ رسیده است درحالی‌که این سهم در سال ۱۹۹۰ حدود ۱۳.۴٪ و برای سال ۲۰۰۰ حدود ۲۵.۷٪ بوده است. از سال ۲۰۰۸ در آسیا تولید آبزیان پرورشی از مقدار صید بیشتر بوده و این روند کماکان ادامه یافته است .در سال ۲۰۱۲ سهم آبزی‌پروری از کل تولید آبزیان در آسیا ۵۴٪ برای اروپا ۱۸٪ و برای سایر کشورها ۱۵٪ است. نرخ رشد تولید آبزیان پرورشی در سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۲ مقدار ۶.۲٪ بوده که نسبت به سال‌های ۱۹۹۰ تا ۲۰۰۰ با ۹.۵٪ و برای سال‌های ۱۹۸۰ تا ۱۹۹۰ با ۱۰.۸٪ کندتر شده است. نرخ رشد تولید آبزیان پرورشی برای سال‌های ۱۹۸۰ تا ۲۰۱۲ داری میانگین ۸.۶٪ در سال بوده است. این نکته مهم است که طی یک دوره ۱۲ ساله کل تولید آبزیان پرورشی (به‌جز گیاهان دریایی) از ۳۲.۴ میلیون تن در سال ۲۰۰۰ به ۶۶.۶ میلیون تن در سال ۲۰۱۲ رسیده که رشد دو برابری داشته است.



نمودار ۱-۱. روند تولید جهانی آبزیان از سال ۲۰۰۷ تا ۲۰۱۲ (FAO, 2014).

در سال ۲۰۱۲، مقدار پرورش سخت‌پوستان (عمدتاً میگوی آب‌شور)۶.۴ میلیون تن بوده که معادل ۹.۷٪ از وزن کل آبزیان خوراکی پرورشی را تشکیل می‌دهد ولی ۲۲.۴٪ ارزش تجارت جهانی آبزیان (۳۰/۹ میلیارد دلار) را به خود اختصاص داده که نشان‌دهنده ارزش‌افزوده بالای این محصول است.

۱-۱-تاریخچه تکثیر و پرورش میگو در جهان

امروزه پرورش میگو به‌عنوان یکی از رشته‌های آبزی‌پروری در همه کشورهایی که بضاعت و استعداد بالقوه‌ای در این زمینه دارند، رو به گسترش است. پرورش میگو مانند بسیاری از رشته‌های آبزی‌پروری از کشورهای جنوب شرقی آسیا شروع شده (متین فر، ۱۳۸۸) و در این قاره پتانسیل فراوانی برای گسترش این حرفه وجود دارد. در این کشورها صید میگو به کمک گرگور یا جعبه و پرورش آن در استخرها سال‌ها به شیوه‌ی سنتی فراگیرنده و مرسوم بوده است.

میزان تولید آبزیان دریایی در سال‌ها اخیر دارای نرخ رشد کاهنده بوده است. صید بی‌رویه، کاهش ذخایر و افزایش جهانی بها سوخت تأثیر منفی بر صیادی در اقیانوس به‌ویژه صید میگو داشته است. میگو از آبزیان باارزش اقتصادی بالا است که با توجه به رشد یافتگی و گسترش صیادی آن، انتظار افزایش کل صید چندانی را از آن نمی‌توان داشت (Rosenberry *et al*, 2004).

افزایش تقاضا برای آبزیان و محدود بودن ذخایر دریایی موجب گردیده تا آبزی‌پروری به‌عنوان مهم‌ترین راه برآورده پروتئین موردنیاز جمعیت روبه رشد جهان و در راستای کاهش فشار تلاش صیادی از دریاها و افزایش درآمد ساحل‌نشینان به‌ویژه در کشورهای کم‌درآمد مورد توجه قرار گیرد. در سال‌های آتی تولید به روش آبزی‌پروری به‌ویژه گونه‌هایی مانند میگو رشد دورقمی خواهد داشت و تولید آبزیان پرورشی بر تولید آبزیان دریایی به‌عنوان منبع اصلی منابع پروتئینی خوراکی، پیشی خواهد گرفت.

پیشینه پرورش میگو در آسیا به بیش از یک سده می‌رسد. نخست میگو به‌عنوان یک محصول جانبی از مزارع پرورش خامه ماهی برداشت می‌شد. در کشورهای اندونزی و فیلیپین، لارو میگوها به هنگام جزر و مد استخرهای پرورش خامه ماهی وارد و در آنجا پرورش می‌یافتند طی سه دهه گذشته قضیه کاملاً برعکس شده و به دلیل سود مناسبی که از پرورش میگو حاصل می‌شد میگو محصول اصلی در این استخرها گردید (متین فر، ۱۳۸۸).

پرورش نوین میگو در سال ۱۹۳۰ ظهور نمود هنگامی‌که موتوساکا فوجی ناگا، دانشمند ژاپنی، فارغ‌التحصیل دانشگاه توکیو موفق به تخم‌کشی از میگوی کروما (*مارسوپئوس ژاپنیکوس*)[8] شد و لارو این میگو را به مرحله پست لاروی رساند. وی در سال ۱۹۳۳ برای نخستین بار میگو را در تانک وادار به تخم‌ریزی نمود و در سال ۱۹۴۰ موفق به پرورش میگو تا اندازه تجاری، در شرایط مصنوعی (تانک) گردید بر همین اساس در سال ۱۹۴۲ اولین گزارش پرورش میگو خود را نیز ارائه داد. ولی بعد به خاطر آغاز جنگ جهانی دوم و مشکلات آن این مسئله چند سالی مسکوت ماند. بعد از جنگ آمریکائی‌ها علاقه‌مند شدند و با پشتیبانی او بر روی گونه‌های آمریکایی کارکردند ولی موفق نشدند. فوجی ناگا دوباره در برگشت به ژاپن کار پرورش را در سال ۱۹۶۳ شروع کرد و در سال ۶۵ ـ ۱۹۶۴) موفق شد تولید انبوه میگو *پئوس ژاپنیکوس* را به انجام برساند. وی به همراهی

[8] - *Marsupenaeus japonicus*

دستیارش در سال ۱۹۶۷ گزارش کامل چگونگی تولید انبوه لارو میگو را ارائه دادند و این گزارش برای نخستین بار جهان را با مسئله پرورش میگو آشنا کرد، او یافته‌ها و مقالات خود را که بیش از ۴۰ سال با دشواری فراوان به دست آورده بود در سال‌های ۱۹۴۲,۱۹۴۱.۱۹۳۵ و ۱۹۶۷ منتشر کرد و امپراتور ژاپن، هیروهیتو، لقب پدر پرورش *پنئوس ژاپنیکوس* را به جهت قدردانی به وی داد. با توجه به قیمت بالای میگو، مدت کوتاه دوره رشد و فن ساده پرورش، پرورش میگو از دهه ۶۰ بسیار سریع در جهان گسترش یافت.

در منطقه خلیج‌فارس در کویت تحقیقات درزمینه‌ی تکثیر و پرورش میگو به‌وسیله دکتر یوشیما اینوموتو، پژوهشگر ژاپنی، از نوامبر ۱۹۶۹ تا اکتبر ۱۹۷۰ بنا به دعوت انستیتو علمی و تحقیقاتی کویت انجام گرفت.

پرورش میگوی وانامی در کشورهای جنوب شرق آسیا از سال‌های آغازین دهه ۱۹۹۰ آغاز شد و به‌سرعت رشد کرد. این روند ادامه دارد و در بسیاری از نقاط جهان میگوی وانامی جایگزین میگوی مونودون شده است. تولید میگوی مونودون از سال ۱۹۹۳ تا ۲۰۰۹ یک و نیم برابر شده ولی تولید میگوی وانامی در همین مقطع ۲۱/۲۲ برابر بوده است. در مجموع تولید وانامی در سال ۲۰۰۹، ۲/۱ برابر مونودون گزارش شده است. پرورش میگوی ایندیکوس از ۱۵۰ تن در سال ۱۹۸۰ به ۱۰/۹ هزار تن در سال ۱۹۹۴ رسید و پس‌ازآن تا سال ۱۹۹۹ کم‌وبیش ثابت ماند. از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۴ روند آن افزایشی بوده و از ۱۶/۴ هزار تن به ۳۳ هزار تن رسیده است. (متین فر، ۱۳۸۸)

شکل ۱-۱. میگوی *لیتوپنئوس وانامی*.

۲-۱-تاریخچه تکثیر و پرورش میگو در ایران

در آب‌های خلیج‌فارس و دریای عمان ۱۸ گونه میگو شناسایی شده است. مهم‌ترین گونه اقتصادی از دید صید و صیادی، میگوی ببری سبز (*پنئوس سمی‌سولکاتوس*[9]) است که در بیشتر زیستگاه‌های خلیج‌فارس و دریای عمان یافت می‌شود اما بیشترین پراکنش و صید آن در آب‌های ساحلی استان بوشهر است. میگوی موزی (*پنئوس*

[9] - *Penaeus semisulcatus*

مرگوئنسیس[10]) که ازنظر تجاری در رده دوم قرار دارد، بیشتر در آب‌های استان هرمزگان صید می‌گردد. دیگر گونه‌ها مانند میگوی سفید هندی (*فنروپنئوس ایندیکوس*)[11] و میگوی ببری سیاه (*پنئوس مونودون*)[12] علی‌رغم داشتن جثه درشت، به دلیل فراوانی اندک و محدودیت زیستگاه، مورد بهره‌برداری اقتصادی قرار نمی‌گیرند. سه گونه میگوی خنجری (*پنئوس استیلیفر*)[13]، سفید (*متاپنئوس آفینیس*)[14] و میگوی ریز سفید در سرتاسر خلیج‌فارس و دریای عمان پراکنش داشته اما ارزش صادراتی ندارند. بهره‌برداری از این سه گونه بیشتر برای مصرف در بازارهای محلی و منطقه‌ای صورت می‌گیرد. (فقیه، ۱۳۸۶)

در کشور ما پرورش میگو از پیشینه فراوانی برخوردار نیست و تنها طی چند سال اخیر به‌طورجدی و به‌عنوان یکی از بهترین کاربردهای اراضی ساحلی و دیگر اراضی غیرقابل کشاورزی مورد توجه قرار گرفته است. تجربیات چند ساله اخیر ایران موجب شده است تا پرورش‌دهندگان میگو این امر را به‌عنوان یکی از اولویت‌های سیاست کاری قرار داده و شمارگان آن‌ها رو به افزایش است و هرروز توجه بیشتری به موضوع پرورش میگو مبذول دارند.

در ایران برای نخستین بار در سال ۱۳۶۳ در پژوهشکده میگوی کشور- بوشهر (مرکز تحقیقات شیلاتی خلیج‌فارس) کار درزمینه‌ی تکثیر و پرورش میگو به‌صورت آزمایشگاهی و بر روی گونه ببری سبز انجام گردید. ادامه این پژوهش‌ها منجر به تخم‌کشی از گونه یادشده در بهار ۱۳۶۸ در شیلات استان بوشهر شد. سپس در همان سال جهت رونق بخشیدن و پا گرفتن صنعت میگو، اداره شیلات استان بوشهر، از امکانات موجودی که داشت اقدام به راه‌اندازی مرکز تکثیر (هچری) کوچکی در منطقه بندرگاه بوشهر نمود و این کارگاه در پایان سال ۱۳۶۹ مورد بهره‌برداری قرار گرفت و عملاً موفق به تولید لارو در سطحی نسبتاً بالا شد.

در سال ۱۳۷۰ کار تکثیر به‌صورت آزمایشگاهی انجام گرفت و در بهار ۱۳۷۰ تکثیر میگوی ببری سبز به‌صورت انبوه در کارگاه تکثیر و پرورش آبزیان شیلات بوشهر، انجام گرفت. هم‌زمان در همین سال در کارگاه کلاهی هرمزگان به دست کارشناس سازمان فائو میگوهای سفید هندی و میگوی موزی و سرتیز تکثیر گردید ولی در بخش پرورش کار مهمی صورت نگرفت. درباره‌ی پرورش میگو در ایران در سال ۱۳۷۱ اقداماتی از سوی شیلات ایران صورت گرفت و ابتدا ۳۰۰۰۰۰ قطعه پست لارو ۱۵ روزه میگوی ببری سیاه از کشور مالزی وارد کشور گردید و جهت گذراندن دوره نرسری به بوشهر منتقل و مدت یک هفته در کارگاه بندرگاه نگه‌داری شدند که پس از طی این دوره و کسب شرایط مطلوب این میگوها به مزرعه پرورش میگو در آبادان منتقل و در سه استخر با سطح مفید ۱/۳ هکتار رهاسازی گردیدند که پرورش آن‌ها نتایج خوبی به دنبال داشت.

---

10 - *Penaeus merguiensis*
11 - *Fenneropenaeus indicus*
12 - *Penaeus monodon*
13 - *Penaeus stylifer*
14 - *Metapenaeus affinis*

همچنین در سال ۱۳۷۱، ۱۰۰۰۰۰ قطعه پست لارو میگوی روزنبرگی نیز از کشور یادشده خریداری و وارد کشور گردید تا آزمایش‌های پرورشی بر گونه آب شیرین نیز صورت گیرد لذا این بچه میگوها جهت پرورش به کارگاه شهید ملکی اهواز انتقال داده شدند که پرورش آن‌ها اگرچه با موفقیت همراه نبود ولی راهگشای اقدامات بعدی در این زمینه گردید. در بندر کلاهی هرمزگان نیز در آن سال اقدام به پرورش آزمایشی گونه‌های ببری سبز، موزی و سرتیز شد.

در سال ۱۳۷۲ بود که پرورش میگو تقریباً در سطح گسترده انجام شد و بخش خصوصی نیز وارد صحنه پرورش میگو گردید. در این سال شرکت سهامی شیلات در سه استان هرمزگان، بوشهر و خوزستان به پرورش میگو در سطحی گسترده‌تر اقدام کرد و این اقدامات در سال بعد (۱۳۷۳) گسترش بیشتری در دو بخش خصوصی و دولتی یافت. سال ۱۳۷۴ را می‌توان سال ورود ایران به عرصه تولید تجاری میگوی پرورشی دانست؛ که گونه‌ی *سفید هندی* گونه رسمی پرورشی در ایران بود و روند رو به رشدی را داشت تا در سال ۱۳۸۱ که مزارع پرورشی آبادان به بیماری ویروسی لکه سفید دچار شد و به دنبال آن در سال ۱۳۸۴ این بیماری مزارع پرورشی استان بوشهر را نیز در برگرفت که باعث کاهش چشمگیری در میگوی پرورشی کشور گردید؛ و سپس در سال ۱۳۸۵ برای نخستین بار پژوهشکده میگوی کشور میگوی سفید غربی (*لیتوپنئوس وانامی*) را به کشور وارد نمود و فنّاوری تکثیر و پرورش آن را بومی نمود. تاکنون ۱۸۰۰۰۰ هکتار زمین‌های لم‌یزرع مناسب برای پرورش میگو در جنوب کشور و چند هزار هکتار زمین‌های مناسب در شرق استان مازندران و سواحل استان گلستان شناسایی‌شده است. تا پایان سال ۱۳۸۴، نزدیک ۴۵۰۰۰ هکتار از این زمین‌ها به درخواست‌کنندگان واگذارشده است که نزدیک ۸۷۰۰ هکتار از این زمین‌ها آماده تولید است. راه‌اندازی ۳۶ واحد مرکز تکثیر، ۶ واحد کارخانه تولید خوراک میگو و ۳۰ واحد کارخانه عمل‌آوری بخشی از زیرساخت‌های موردنیاز صنعت تکثیر و پرورش میگو است که در این سال‌ها به وجود آمده است. میزان تولید میگوی پرورشی در کشور از ۵۴ تن در سال ۱۳۷۳ به ۲۵۰۷.۵ تن در سال ۱۳۸۶ رسیده است. بیشینه میزان تولید میگوی پرورشی در کشور در اوج فعالیت صنعت پرورش میگو در سال ۱۳۸۳ به ۸۹۳۰ تن رسیده که استان بوشهر با ۵۶۰۰ تن (۶۳٪ کل کشور) در این امر پیشرو بوده است. طی سال‌های گذشته بنا به دلایل متعدد باز ایستایی شدیدی دامن‌گیر این صنعت شد تا جایی که از کل زمین‌های واگذارشده به بخش خصوصی، تنها ۷۵۰۰ هکتار از آن‌ها به بهره‌برداری رسیده و از این مقدار نیز طی ۲ تا ۳ سال گذشته عملاً کمتر از ۴۰ درصد آن به زیر کشت رفته است. بروز مسائلی مانند افت قیمت میگوی پرورشی در بازارهای جهانی، رقابت شدید در بازار جهانی میگو، بالا بودن نرخ تورم و ثبات نرخ ارز، بالا بودن نرخ سود و کارمزد تسهیلات بانکی، عدم تکمیل زیرساخت‌های موردنیاز، پایین بودن بهره‌وری تولید در مراکز تکثیر، عدم دسترسی به منابع مولد مناسب، پایین بودن بهره‌وری تولید در مزارع پرورش، پائین بودن نسبی سطح مدیریت و فن‌آوری در حلقه‌های مختلف تولید و بروز بیماری‌هایی مانند لکه سفید در استان‌های خوزستان و

بوشهر و رخداد توفان گنو در استان سیستان و بلوچستان تولید میگو را به حداقل رسانده و باعث شده تا این صنعت با تنگناهای بسیاری روبرو شود.

توجه به تنوع گونه‌ای میگو با دید منطقه‌ای، تکثیر و پرورش گونه‌های با توان تولید بالا و مقاوم در برابر شرایط گوناگون بوم‌شناختی‌ای، مقاوم در برابر بیماری، سریع الرشد همچنین کاهش هزینه‌های تولید، افزایش تولید در واحد سطح و افزایش سطح زیر کشت میگو از راهکارهای دستیابی به اهداف کیفی و کمی شیلات ایران و مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور در برنامه‌های توسعه‌ای کشور است. انجام پژوهش‌ها پیرامون موارد فوق، بهداشت و بیماری‌های میگو، تغذیه، ژنتیک و اصلاح نژاد میگو و در پایان فرآوری میگو، تقویت بنیادین ساختار صنعت میگوی کشور را اجتناب‌ناپذیر می‌نماید.

۳-۱- تاریخچه تکثیر و پرورش میگو در استان بوشهر

استان بوشهر با اختصاص بیش از ۵۶ درصد از اراضی زیر کشت میگو و ۶۴ درصد تولید میگوی پرورشی کشور به خود در سال ۱۳۸۳ به‌عنوان پیشتاز صنعت پرورش میگو در کشور شناخته می‌شود. تحقیقات پیرامون امکان تکثیر و پرورش میگو برای اولین بار در کشور سال ۱۳۶۳ در مرکز تحقیقات شیلاتی خلیج‌فارس-بوشهر با تخم‌کشی از میگوی ببری سبز آغاز گردید. در سال ۱۳۷۴ برای نخستین بار میگوی پرورشی در منطقه حله بوشهر توسط بخش غیردولتی به مرحله تولید انبوه رسید تولید میگو از سال سوم پرورش میگو در استان، سیر صعودی داشت بطوریکه که در سال ۷۸ از مرز هزار تن فراتر رفته است که این را می‌توان مدیون تجربیات پرورش‌دهندگان و استفاده از ابزار روز دانست. از سال ۱۳۷۷ تا سال ۱۳۸۴ پرورش‌دهندگان فقط میگوی سفید هندی پرورش دادند؛ و از سال ۸۵ تاکنون به پرورش وانامی روی آورده‌اند.

میگوی وانامی دارای توانایی متعددی از جمله جزء سریع الرشدترین گونه‌های تجاری میگو، مقاوم به دامنه وسیعی از تغییرات دما و شوری، ماندگاری بالا در مراحل لاروی در نوزادگاه و در شرایط استخرهای پرورشی است. نیاز پروتئینی پایین نسبت به سایر گونه‌های میگو، بازار مصرف شناخته شده، تولید لاین‌های مولد مقاوم به بیماری و لاین‌های مولد عاری از بیماری و نهایتاً هزینه تولید پایین است. این خصوصیات مناسب، این میگو را به‌عنوان جایگزین خوبی برای میگوهای تجاری و پرورشی مناطق مختلف دنیا که به علت ابتلا به بیماری کشنده مانند لکه سفید توان تولید انبوه را از دست داده‌اند، است.

سهم تولید میگوی پرورشی نسبت به میزان صید میگوی دریایی در سال‌های ۷۶ و ۷۷ بسیار ناچیز بوده ولی از سال سوم جایگاه آن در تولید مشخص‌تر است، به‌طوری‌که در سال ۷۸ سهم تولید میگوی پرورشی استان نسبت به صید میگوی دریایی به بیش از دو برابر صعود نموده است. با بروز بیماری لکه سفید در سال ۸۴ تولید میگوی پرورشی نسبت به تولید دریایی سیر نزولی طی کرده است ولی با معرفی میگوی وانامی این صنعت جان تازه‌ای گرفته است.

در حال حاضر ۶۰ هزار هکتار اراضی مستعد پرورش میگو در استان بوشهر شناسایی گردیده که در صورت سرمایه‌گذاری و به زیر کشت بردن، می‌تواند به‌صورت بالقوه تولیدی بالای ۱۵۰ هزار تن در سال را برای استان به دنبال داشته باشد. تاکنون ۸۰۰۰ هکتار از اراضی به متقاضیان واگذار شده است. از این اراضی تاکنون حدود ۴۰۰۰ هکتار آماده کشت است. برای تولید بچه میگوی مورد نیاز مزارع پرورشی مجوز ۲۱ مرکز تکثیر صادر شده که ۱۷ مرکز آن به بهره‌برداری رسیده است. به‌منظور تأمین غذای مورد نیاز این صنعت یک کارخانه با ظرفیت ۲۰ هزار تن در سال در حال تولید است و یک واحد دیگر با ظرفیت ۱۵ هزار تن آماده بهره‌برداری است. همچنین جهت عمل‌آوری میگو در استان ۲۱ کارخانه عمل‌آوری وجود دارد که تعداد ۱۷ واحد آن دارای کد بین‌المللی EEC می‌باشند. جهت نظارت بهینه و پشتیبانی بهداشتی صنعت، یک مرکز تشخیص و مطالعات بیماری‌های میگو در استان توسط دامپزشکی ساخته شده است. در خصوص آموزش‌های نیروهای فنی نیز وجود مجتمع آموزش جهاد کشاورزی استان و رشته شیلات در دانشگاه خلیج‌فارس- بوشهر سبب شده تا این صنعت با پشتوانه علمی مؤثرتری در آینده به توسعه خود امیدوار باشد. همچنین پژوهشکده میگوی کشور، در استان بوشهر، با انجام پروژه‌های تحقیقاتی درزمینهٔ تنوع گونه‌ای، مولدسازی و معرفی گونه‌های جدید میگو فعالیت می‌کند.

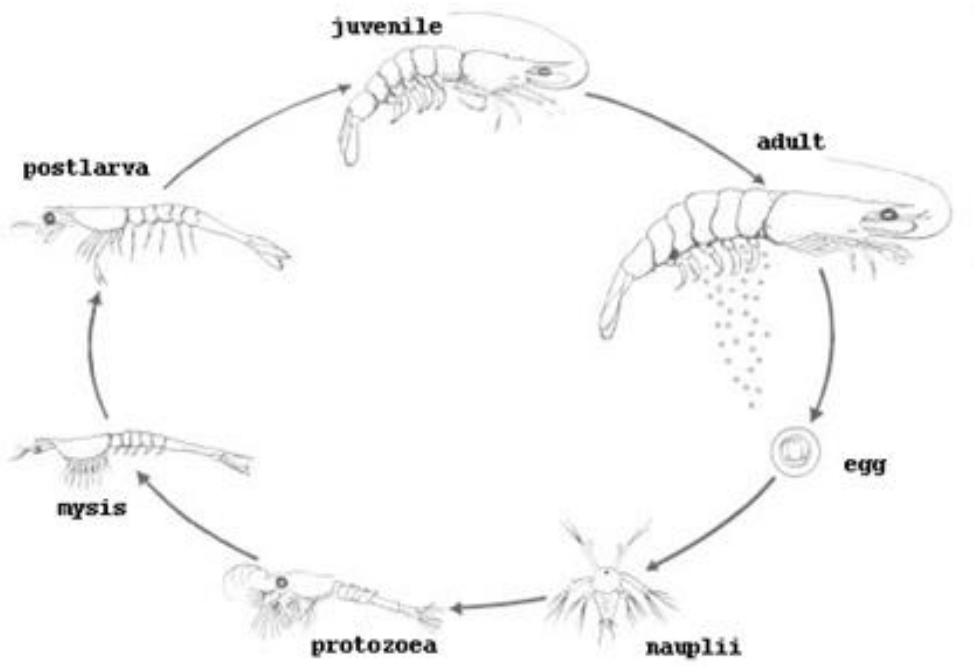
٤-١-کلیاتی بر میگوی لیتوپنئوس وانامی

١-٤-١. تعریف علمی

لیتوپنئوس وانامی که میگوی سفید غربی نیز نامیده می‌شود، یکی از گونه‌های مهم اقتصادی میگو در جهان است. لیتوپنئوس یکی از جنس‌های خانواده پنائیده که شامل گونه‌های زیادی بوده و در آبزی‌پروری دارای ارزش اقتصادی بالا است.

٢-٤-١- چرخه زندگی میگو

بسته به درجه حرارت شکوفایی تخم‌ها ظرف ۸ تا ۱۲ ساعت بعد از تخم‌ریزی صورت می‌گیرد. برای رشد لارو میگو بایستی از مراحل مختلف و متمایز قبل از رسیدن به مرحله پست لاروی عبور نماید. مرحله ناپلئوسی که لارو شناگر آزاد بوده و تغذیه نمی‌کند و شامل ۶ زیر مرحله است. مرحله پروتوزوآ و مایسیس هرکدام شامل سه زیر مرحله بوده که بعد از آن لارو وارد مرحله پست لاروی شده که از نظر ظاهری شبیه بالغین است (شکل ۱-۲).



شکل۱-۲. چرخه زندگی میگو

لارو میگو در مرحله ابتدایی ناپلئوسی از کیسه زرده تخم تغذیه کرده و سپس از جلبک‌های میکروسکوپی و زئوپلانکتون‌ها در مراحل پروتوزوآ استفاده می‌نماید. از مرحله مایسیس و مراحل بعدی لارو میگو و میگوهای جوان قادر هستند از طیف گسترده‌ای از ارگانیسم‌های غذایی همچون آرتمیا، کرم پلی کت، سخت‌پوستان کوچک و همچنین دتریتوس بستر تغذیه نمایند (ویلاین، ۱۳۷۹).

۳-٤-۱- بیولوژی میگوی لیتوپنئوس وانامی (سفید غربی)

میگوی *لیتوپنئوس وانامی* بومی سواحل غربی آمریکای لاتین در اقیانوس آرام از پرو در جنوب تا مکزیک در شمال است. از اواخر دهه ۱۹۹۰ این‌گونه در مقیاس تجارتی با موفقیت در آسیا پرورش یافت. این‌گونه سریع-الرشد نسبت به بیماری‌های رایج میگو و شرایط نامطلوب اکولوژیکی مقاوم است. سرعت رشد میگوی سفید غربی معادل میگوی ببری سیاه است و می‌تواند تا ۳ گرم در هفته رشد کرده و در شرایط پرورش متراکم (تا ۱۵۰ قطعه در مترمربع) به وزن ۲۰ گرم (حداکثر وزن معمول در شرایط پرورشی) برسد. در اوزان بیش از ۲۰ گرم از سرعت رشد این میگو (مخصوصاً نرها) کاسته شده و به ۱ گرم در هفته تنزل می‌یابد. میگوی سفید غربی قادر به تحمل دامنه وسیعی از درجه حرارت است اما همانند اغلب دیگر گونه‌های استوایی و نیمه استوایی در دمای $^{\circ}C$ ۲۳ تا ۳۰ بهتر رشد می‌کند. مناسب‌ترین درجه دما برای رشد این‌گونه در میگوهای کوچک (۱ گرمی) $^{\circ}C$ ۳۰ و برای میگوهای بزرگ‌تر (۱۲ تا ۱۸ گرمی) $^{\circ}C$ ۲۷ است. میگوی سفید غربی دامنه وسیعی از درجات شوری از

ppt ۰/۵ تا ۴۵ را تحمل می‌کند. در محدوده ۷ppt تا ۳۴ میگو رشد می‌کند و بهترین درجه شوری برای رشد آن در حدود ppt ۱۰ تا ۱۵ است. پرورش میگوی سفید غربی در تراکم‌های بسیار بالا و تا ۱۵۰ قطعه در مترمربع مقدور است و در شرایط بسته و تحت کنترل می‌توان تراکم را تا ۴۰۰ قطعه در مترمربع افزایش داد. در مقایسه با سایر گونه‌های رایج پرورشی نیاز به غذاهایی با پروتئین کمتر (۲۰ تا ۳۵ درصد) دارد و درنتیجه غذای آن ارزان‌تر است. بیشترین میانگین تولید میگوی وانامی با کنترل بالای بهداشتی- ویروسی و در سیستم مداربسته فوق متراکم تا ۶۳ تن در هکتار گزارش شده است (متین فر؛ ۱۳۸۸).

شکل ۱-۱. میگوی سفید غربی پرورشی

۱-۵- میگوی ببری سبز

میگوی ببری سبز یکی از اولین میگوهای بومی کشور است که از ذخایر قابل توجهی برخوردار بوده و حضور آن در تمامی آب‌های خلیج‌فارس و دریای عمان به‌خصوص در آب‌های ساحلی استان بوشهر قابل توجه است. میگوی ببری سبز در کشور ما در سال‌های نخست توسعه پرورش میگو به‌عنوان اولین گونه بومی با شرایط مناسب برای تکثیر و پرورش مورد توجه قرار گرفت و در همان سال‌ها در استان‌های بوشهر و هرمزگان به تولید قابل قبول در عرصه تکثیر و پرورش رسید. تکثیر آزمایشی این گونه در ایران در سال‌های ۱۳۶۳-۶۴ در پژوهشکده میگوی کشور (مرکز تحقیقات شیلات خلیج‌فارس) در استان بوشهر به‌صورت محدود و در سطح آزمایشگاهی انجام شد. میگوی ببری سبز برای اولین بار در سال ۱۳۷۰ در سطح انبوه و تجاری در مرکز تکثیر بندرگاه استان بوشهر با تولید ۳۰۰ هزار قطعه بچه میگو، تکثیر شد. متعاقباً در سال ۱۳۷۱ علاوه بر مرکز تکثیر بندرگاه بوشهر، مرکز تکثیر و پرورش میگوی کلاهی در استان هرمزگان، اقدام به تکثیر این گونه در سطح تجاری نمود. در سال ۱۳۷۶ میگوی ببری سبز به علت تلفات و بازماندگی پایین جایگاه خود را در بین پرورش‌دهندگان از دست داد. با توجه به اهمیت گونه‌های بومی، تحقیقات پیرامون این گونه تا سال ۱۳۸۲ ادامه داشت.

تصویر ۱-۲. میگوی ببری سبز بدون باند صید شده از آب‌های استان بوشهر

تصویر ۱-۳. میگوی ببری سبز باندار صید شده از آب‌های استان بوشهر

٦-۱- میگوی سفید هندی *Fenneropenaeus indicus*

پرورش میگوی سفید هندی از سال ۱۳۷۴ در پژوهشکده میگوی کشور (مرکز تحقیقات میگو) آغاز گردید. از سال ۱۳۷۷ با رویگردانی پرورش‌دهندگان از میگوی ببری سبز، پرورش میگوی سفید هندی در مقیاس تجاری شروع شد. این گونه بومی آب‌های استان هرمزگان و سیستان و بلوچستان است. میگوی سفید هندی نسبت به میگوی ببری سبز در برابر شوری مقاوم‌تر است. این گونه به دلیل شیوع بیماری لکه سفید در استان‌های خوزستان و بوشهر جای خود را به میگوی غیربومی سفید غربی داد. اما همچنان تا چندین سال میگوی سفید هندی به عنوان گونه ی پرورشی در دو استان سیستان و بلوچستان و هرمزگان ادامه داشت تا نهایتاً بعد از وقوع بیماری در استان سیستان و بلوچستان و مزایای پرورش میگوی سفید غربی باعث شدند که این دو استان نیز روی به پرورش سفید غربی بیاورند.

۷-۱- میگوی موزی *Penaeus merguensis*

میگوی موزی در آب‌های ساحلی استان هرمزگان یافت می‌شود. این گونه به دلیل داشتن پوسته نازک از سایر گونه‌ها حساس‌تر است و شرایط پس از صید را به‌سختی تحمل می‌کند. درصورتی‌که زمان بین صید و تخم‌کشی آن کوتاه باشد به‌راحتی تکثیر می‌گردد. تحقیقات پیرامون میگوی در دریا و پیرامون شرایط زیست‌محیطی و ارزیابی ذخایر آن از سال ۱۳۷۱ آغاز گردید. تکثیر و پرورش این گونه از سال ۱۳۷۵ شروع شد. پرورش میگوی موزی در مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان منجر به تولید حدود یک تن در هکتار گردید.

تصویر ۱-٤. میگوی موزی صید شده از آب‌های استان هرمزگان

با توجه به موارد مطروحه فوق و نظر به مواردی چون اختلاط گونه‌ها، عاری بودن از بیماری و موارد مثبت و منفی ذکر شده ناشی از پراکندگی جغرافیایی گسترده این‌گونه جانوری و یا اعمال فشارهای اصلاحی ناشی از صنعت پرورش میگو و با در نظر گرفتن این نکته که یکی از محصولات پر ارزش خلیج‌فارس و دریای عمان، میگو است لزوم مطالعات دقیق مولکولی، ایجاد شناسنامه برای گونه‌های موجود و شناسایی گونه‌های ناشناخته جهت مدیریت بهینه منابع زیستی بسیار برجسته و بارز است.

خصوصیات مورفولوژی در سطح زیادی برای شناسایی و تقسیم‌بندی سخت‌پوستان، خصوصاً میگوها به کار گرفته شده است. خصوصیات مورفولوژی مشابه و غیرقابل تشخیص علی‌رغم تفاوت‌های ژنتیکی، در تاکساها به‌عنوان گونه‌های خاموش (پنهان) تعریف می‌شوند. تفکیک گونه‌های خاموش با توسعه نشانگرهای مناسب مولکولی و سایر خصوصیات بارز مثل الگوی رنگ-بندی امکان‌پذیر است. در میان نشانگرهای مولکولی ژن سیتوکروم اکسیداز میتوکندریایی یکی از معتبرترین نشانگرها برای تفکیک گونه‌ها از یکدیگر است. استفاده از این ژن برای شناسایی گونه‌ها در سال‌های اخیر منجر به ایجاد زمینه‌ای جدید در علم تاکسونومی در جهت شناسنامه‌دار کردن موجودات مختلف به نام DNA بارکدینگ شده است.

۸-۱- تاریخچه و اهمیت DNA بارکدینگ

تنوع زیستی هر کشور ذخیره‌ای ارزشمند و درعین‌حال آسیب‌پذیر است. گردآوری، شناسایی و مطالعه نمونه‌های زیستی از جمله نخستین گام‌ها در راستای حفاظت و بهره‌برداری دانشورانه از تنوع زیستی است .آگاهی از تنوع زیستی و توانایی شناسایی جانداران - که جزئی از آن است -کالاهایی جهانی هستند؛ یعنی سودهای برآمده از این دانش به همه کشورهای جهان می‌رسد، بهره‌ای که هیچ کشوری به تنهایی نمی‌تواند به آن دست یابد.

طبق بند ۷ کنوانسیون تنوع زیستی (CDB, 1993) هر متعهدی باید تا حد ممکن و به شیوه‌ای مناسب به‌ویژه در راستای حفظ و بهره‌برداری پایدار:

- ✓ اجزای تنوع زیستی را شناسایی کند،
- ✓ از راه نمونه‌برداری و روش‌های دیگر پایش نماید
- ✓ داده‌های برآمده از شناسایی و پایش را نگهداری و سازمان‌دهی کند.

روش‌های شناسایی سنتی گونه‌های زیستی اغلب از روش‌های مورفولوژیک پیروی می‌کنند. واضح است که با این روش‌های شناسایی مدت‌زمان زیادی برای شناسایی هر موجود صرف می‌شود. به‌ویژه در مورد حشرات که هم به لحاظ اینکه عامل انتقال انواع بیماری‌های گیاهی، دام و انسان هستند و هم به لحاظ تنوع زیستی بخش بسیار بزرگی از تنوع زیستی ناشناخته را تشکیل می‌دهند و نیز در مورد انواع موجودات دریایی و آبزی روش‌های سنتی نمی‌توانند روش مناسبی برای شناسایی باشند. خط‌شناسه‌گذاری **DNA** یا DNA barcoding ابزاری جدید و جذاب بر اساس DNA حفاظت‌شده موجودات در پژوهش‌های تاکسونومی است (حاجی بابایی و همکاران ۲۰۰۷). این روش در سال‌های ۲۰۰۳-۲۰۰۲ مطرح شده و به سرعت به‌عنوان ابزاری استاندارد و جهانی برای شناسایی گونه‌های مختلف موجود در تنوع زیستی تبدیل شد. خط‌شناسه DNA و یا بارکد DNA یک توالی بسیار کوتاه استاندارد از یک ژن کاملاً شناخته شده است. به کمک این توالیDNA می‌توان پی برد که هر جانور، گیاه یا قارچ به چه گونه‌ای تعلق دارد.

خط‌شناسه یک نمونه ناشناخته را با روش‌های استاندارد توالی یابی ژن می‌توان خواند .خط شناسه گذاری سه نوع فعالیت را در برمی‌گیرد:

- ✓ کار با جانداران :گردآوری، شناسایی و نگهداری نمونه‌های گواه در موزه‌ها یا بانک‌های مطمئن.
- ✓ فرایندهای آزمایشگاهی :جدا کردن و پردازش کردن قطعات بافت از نمونه برای رسیدن به توالی خط شناسه DNA.
- ✓ مدیریت داده‌ها :به اشتراک گذاشتن توالی خط‌شناسه و داده‌های وابسته به نمونه گواه آن در یک پایگاه داده‌ای عمومی.

بارکد DNA برای گونه‌های جانوری قطعه‌ای به طول ۶۵۰ جفت‌باز از ژن سیتوکروم اکسیداز-۱ میتوکندریایی است. این ژن علاوه بر این‌که در بین جانوران مختلف به‌خوبی حفظ شده است اما بخش کوچکی از آن در هر

گونه نسبت به گونه دیگر تفاوت نشان می‌دهد و در واقع مانند یک اثر انگشت برای هرگونه است. طبق توافق هر باز با رنگ ویژه‌ای مشخص می‌شود و در نهایت توالی آن قطعه همانند بارکدی متشکل از رنگ‌های سبز، آبی، سیاه و قرمز برای هر گونه جانوری در پایگاه داده ثبت شده و در دسترس عموم قرار می‌گیرد. کنسرسیوم DNA barcoding (Consortium for the Barcode of Life-CBOL)به‌عنوان تشکلی بین‌المللی برای استانداردسازی پروتکل‌ها و ثبت و استفاده از این توالی‌ها تشکیل‌شده و پروژه‌های عظیم بارکدینگ گونه‌های جانوری با همکاری کشورهای مختلف از سال ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۵ تحت نظارت این کنسرسیوم تحت عنوان فاز اول بارکدینگ تنوع زیستی در حال انجام است. کنسرسیوم بارکدینگ تلاش می‌کند چارچوبی برای همکاری‌های بین‌المللی پدید آورد تا همه کشورها بهتر بتوانند به ارزیابی و حفظ تنوع زیستی خود بپردازند.

تنها بخش کوچکی از گونه‌های موجودات زنده برای دانشمندان و به لحاظ علمی شناخته شده‌اند. دلیل عدم شناسایی بخش اعظم تنوع زیستی وقت‌گیر و پرهزینه بودن روش‌های شناسایی مورفولوژیک و عدم وجود اختصاصیت لازم برای انواع موجودات است. استفاده از روش بارکدینگ DNA، به‌عنوان یک ابزار استاندارد دانشمندان تنوع زیستی را قادر ساخته است تا با سرعت و با صرف هزینه اندک علاوه بر این‌که بارکد گونه‌های شناخته شده موجود را شناسایی و ثبت کنند، بتوانند گونه‌های جدید را شناسایی کرده و شاخه‌های درخت حیات را افزایش دهند. امروزه در اغلب آزمایشگاه‌های مجهز، فرایندهای آزمایشگاهی بارکدینگ برای هر نمونه در کمتر از چند ساعت و. با صرف هزینه‌های اندک قابل انجام است. امروزه، این زمان در برخی آزمایشگاه‌ها به ۹۰ دقیقه کاهش داده شده است .هزینه‌ها دائماً رو به کاهش هستند و بارکدینگ سریع‌تر می‌شود. در حال حاضر طبق آمار کنسرسیوم جهانی بارکدینگ تعداد ۳۰۰۰۰ گونه آبزی، ۱۰۰۰۰ گونه پرندگان، ۲۰۰۰ گونه حشرات سودمند و ۳۳۰۰ گونه پشه تا سال ۲۰۱۰ انجام شده است و پروژه‌های فاز اول این کنسرسیوم از سال ۲۰۱۰ آغاز شده و تا سال ۲۰۱۵ منجر به بارکدینگ بیش از ۵ میلیون نمونه جانوری دربرگیرنده بیش از ۵۰۰۰۰۰ گونه خواهد شد. این گونه‌ها به‌عنوان نمونه گواه نگهداری شده و مرجع شناسایی گونه‌های جدید و نیز گونه‌های مشابه که تاکنون در طبقه‌بندی تاکسونومی وارد نشده‌اند خواهند بود.

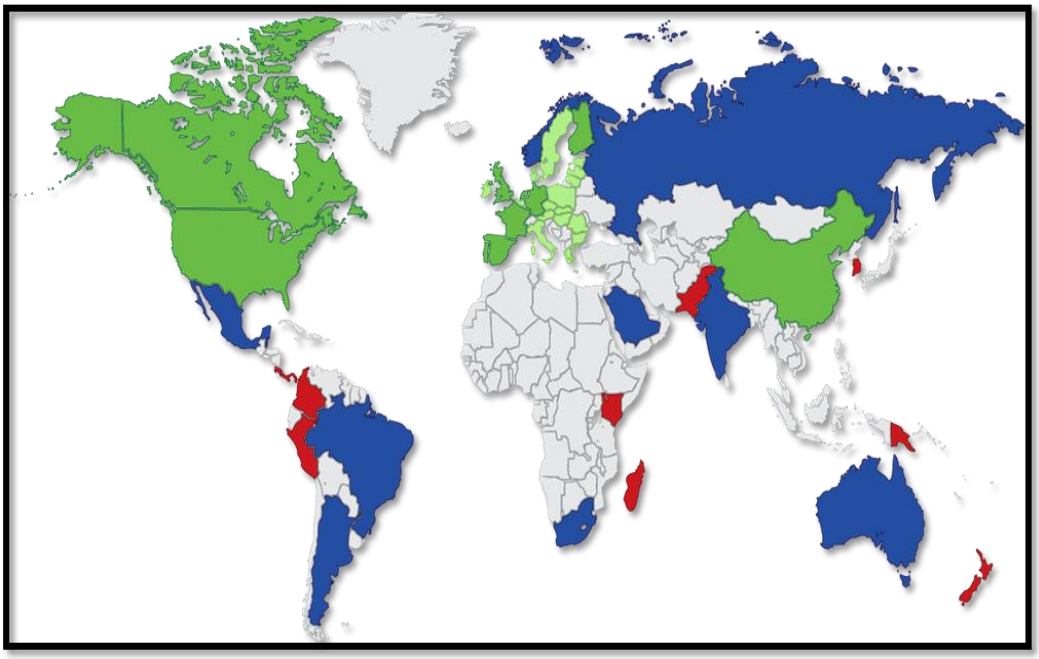
در میان پروژه‌های فاز اول بارکدینگ، بارکدینگ پستانداران، حشرات و آفات، ماهیان و آبزیان، پرندگان و غیره با سرعت زیادی در حال انجام بوده و پیشرفت‌های چشمگیری در غنی کردن پایگاه داده‌های خط شناسه DNA برای گونه‌های مختلف جانوری داشته‌اند. در پروژه بین‌المللی آبزیان و ماهی‌ها تاکنون بیش از ۱۰۸۸۰۰ نمونه بارکد شده است که این تعداد نمونه متعلق به ۱۰۸۲۳ گونه می‌باشند.

علی‌رغم این‌که پروژه‌های بارکدینگ DNA از انواع نمونه‌های زیستی در سرتاسر دنیا و حتی خاورمیانه در حال انجام می‌باشند متأسفانه کشور ایران با داشتن تنوع بسیار عظیم جانوری و زیستی هنوز به‌طور رسمی وارد همکاری با کنسرسیوم جهانی بارکدینگ نشده و اقدام به اجرا و انجام پروژه‌های بارکدینگ DNA و در نتیجه ثبت تنوع زیستی ایران در پایگاه داده جهانی نکرده است. این در حالی است که کنسرسیوم جهانی بارکدینگ

دی ان ا، در قالب پروژه‌های بین‌المللی از تمام کشورها و مراکز ذیصلاح شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر ژنتیکی در آن کشورها دعوت به همکاری نموده و برای سال‌های ۲۰۱۵-۲۰۱۰ اولین پروژه‌های بین‌المللی خود را تعریف و در حال حاضر در حال انجام آن‌ها است. پروژه‌های بین‌المللی مذکور شامل بارکدینگ آبزیان و ماهی‌ها، بارکدینگ پرندگان، بارکدینگ قارچ‌ها، حشرات و آفات مهاجم، بارکدینگ حشرات ناقل بیماری‌های انسانی و دامی، بارکدینگ پستانداران، حیوانات قطبی، زنبور عسل و پروانه‌سانان و بارکدینگ برای حفاظت گونه‌ها می‌باشند.

۱-۸-۱- وضعیت DNA بارکدینگ در ایران

متأسفانه کشور ایران علی‌رغم دارا بودن تنوع وسیع زیستی تاکنون اقدام به اجرا و انجام پروژه‌های منسجم بارکدینگ نکرده است و تنها در مواردی جزئی و به‌صورت کاملاً گسسته در برخی مراکز تحقیقاتی و دانشگاه‌ها بارکدینگ DNA از برخی گونه‌های آبزیان و یا حشرات انجام گرفته است و این در حالی است که بیش از ۱۰۰ موسسه از بیش از ۴۰ کشور عضو رسمی کنسرسیوم جهانی بارکدینگ بوده و در قالب سه هسته و گروه به فعالیت درزمینهٔ شناسایی تنوع زیستی مشغول هستند. گروه اول شامل کشورهایی مانند پاکستان، پرو، کاستاریکا، کنیا، کره، ماداگاسکار و گینه‌نو به‌عنوان "National Node" (رنگ قرمز در نقشه) مأموریت جمع‌آوری، شناسایی و ارزیابی گونه‌های جانوری از کشور خود را دارند. گروه دوم شامل کشورهایی مانند آرژانتین، برزیل، هندوستان، آفریقای جنوبی، استرالیا، عربستان سعودی، نروژ، مکزیک، زلاندنو و روسیه است که به‌عنوان "Regional Node" (رنگ آبی در نقشه) شناخته شده و علاوه بر پروژه‌های بارکدینگ خود با دارا بودن ابزارهای توالی یابی به سایر کشورها نیز در شناسایی بارکد و ثبت آن کمک می‌کنند؛ و "Central Node" (رنگ سبز در نقشه) که شامل کشورهای کانادا، چین، فرانسه، فنلاند، آلمان، هلند، پرتغال، انگلستان و آمریکا است و نقش تدوین استانداردها، ارزیابی داده‌ها، مدیریت بانک‌های اطلاعاتی و برگزاری همایش‌ها و تخصیص بودجه و کمک به سایر کشورها جهت تنوع زیستی‌شان و ثبت آن فعالیت می‌کنند.



بر اساس گزارش سازمان جهانی خواربار و کشاورزی، فائو، منابع ژنتیکی نقش مهمی در تغذیه جهان بازی می‌کنند. به‌ویژه در زمان‌هایی که تغییرات آب و هوایی سریع‌تر از انتظار اتفاق می‌افتد. به همین دلیل این موضوع احتیاج به مطالعه بیشتر دارد تا بتوان تنوع زیستی را حفظ و مواد غذایی را تولید کرد.، در دهه‌های آینده، معیشت و امنیت غذایی میلیون‌ها آدم به کشاورزی، آبزی‌پروری، ماهیگیری، جنگلداری و نگهداری دام بستگی دارد که این ها هم تحت تأثیر تغییرات بی سابقه آب و هوایی هستند. محصولات کشاورزی، دام، درختان جنگلی و موجودات آبزی به زنده ماندن و تولید مثل در یک آب‌وهوای در حال تغییر نیاز دارند.

توانایی گیاهان و حیوانات و مقاومت در برابر شرایط تغییر آب و هوایی و انطباق با تغییرات محیط‌زیست نتیجه مستقیم تنوع ژنتیکی است. جلوگیری از ضرر و زیان بیشتر منابع ژنتیکی دامی و کشاورزی نیاز به توجه بیشتر و مطالعه توانایی‌های بالقوه دارد. همچنین باید توانایی انسان برای انطباق با تغییرات آب و هوایی تقویت شود. البته چنین رویکردی تطبیقی نیاز به به روزرسانی اهداف برنامه های اصلاحی دارد و در برخی موارد باید ارقام، نژاد، گونه‌ها که قبلاً مطرح نشده‌اند، معرفی شود. این گزارش همچنین اضافه می کند، به‌طور خاص، ارتقاء دانش، حفاظت و استفاده از محصولات کشاورزی وحشی که خودبه‌خود می‌رویند، مهم است. چرا که آن‌ها به احتمال زیاد صفات ژنتیکی دارند که می توان از آن‌ها به‌عنوان توسعه محصولات دامی و کشاورزی سازگار با محیط در شرایط تغییرات آب و هوایی استفاده کرد.

به‌هرحال، بسیاری از گونه‌های محلی سازگار و نژادهای محصولات کشاورزی و دام، همچنین درختان، ماهی‌ها، حشرات و میکروارگانیسم ها ضعیف هستند و ممکن است قبل از انطباق با تغییرات آب و هوایی از دست بروند.

به این ترتیب باید سعی شود تا از اعمالی که به از بین بردن تنوع زیستی و یا تضعیف سلامت اکوسیستم‌ها می‌انجامد، جلوگیری شود چرا که افزایش حفاظت از تنوع ژنتیکی در مزارع و نگهداری بانک ژن، حیاتی است. از سوی دیگر، تغییرات شرایط اقلیمی و جغرافیایی طی سال‌های متمادی بر جمعیت‌های آبزیان تأثیر گذاشته و سبب تغییرات، تنوع ژنتیکی یا انقراض گونه‌ها گردیده است. اعمال مدیریت صحیح بر ذخایر آبزیان و توسعه آبزی‌پروری زمانی با موفقیت همراه خواهد بود که شناسایی ذخایر ژنتیکی گونه‌های بومی منطقه مورد مطالعه قرار گیرد. اولین گام در این زمینه شناخت صحیح گونه‌ها، جمعیت‌ها و نژادها است.

۲- بررسی منابع

آنچه می‌توان در ارتباط با بررسی و شناسایی مولکولی و طبقه‌بندی فیلوژنتیکی میگو اظهار کرد این نکته است که با توجه به گستردگی مصرف و پراکندگی در جهان مطالعات محدود و معدودی صورت گرفته است. به جهت مشکلات مربوط به شناسایی فنوتیپی میگو به دلایلی چون دفرمگی اندام‌های شناساگر، تفاوت فنوتیپ مراحل مختلف چرخه زیستی از لارو تا میگوی بالغ که بعضاً باعث طبقه‌بندی و تعیین هویت اشتباه می‌گردد لزوم استفاده از ابزار دقیق و قدرتمند برای شناسایی، تعیین هویت و طبقه‌بندی این موجودات آبزی استراتژیک از لحاظ تغذیه و اقتصادی بسیار حیاتی است. در این رابطه مطالعات چندی با استفاده از مارکرهای مولکولی و یا سایر روش‌های مشابه در ایران و جهان صورت پذیرفته است اما بارکدینگ DNA که با توالی یابی بخش شاخص ژن سیتوکروم اکسیداز میتوکندریایی انجام می‌پذیرد به‌عنوان روشی نوین و استاندارد جهت این امر پذیرفته شده است.

در سال ۱۳۹۰، رؤیا رهنما و همکاران با استفاده از ژن 16S rRNA میتوکندریایی اقدام به مقایسه مولکولی اولیه *P. semisulcatus* خلیج‌فارس و زیرگونه آن *P. semisulcatus persicus*، نمودند. در این تحقیق ۱۰ قطعه از گونه *P. semisulcatus* از سواحل بوشهر و بندرعباس و ۱۰ قطعه از زیرگونه آن را به‌وسیله توالی ژن 16S rRNA میتوکندریایی با استفاده از روش Kimura 2-parameter و نرم‌افزار MEGA 4.0.2 مورد آنالیز مولکولی قرار گرفتند و درنتیجه مشخص گردید که بر اساس ناحیه ۴۶۷ جفت بازی توالی ژن 16S rRNA میگوی ببری سبز خلیج‌فارس (حاصل از این تحقیق) و میگوی سبز از هند تفاوتی باهم ندارند، در صورتی که تفاوت میان گونه فوق و زیرگونه آن قابل توجه است.

در سال ۱۳۹۳، سیوان رضایی و همکاران با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی SSR به بررسی تنوع ژنتیکی در میگوی *Litopenaeus vannamei* در بندر جاسک استان هرمزگان پرداختند. در این تحقیق با مطالعه بر روی ۳۰ نمونه از دو مزرعهٔ امیری و گورگیج در بندر جاسک استان هرمزگان و ردیابی چهار نشانگر ریز ماهواره‌ای و استفاده از تجزیه‌وتحلیل واریانس مولکولی (AMOVA)، نشان دادند که تمایز ژنتیکی متوسط و جریان ژنی کافی بین دو جمعیت مطالعه شده وجود دارد. FIS متوسط و FST بالا بر اهمیت ارزیابی مداوم تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های میگوی وانامی پرورشی در هرمزگان تأکید می‌کنند.

در سال ۲۰۰۵، در تحقیقی مشابه وارد و همکاران ۱۰۷ گونه ماهی دریای استرالیا را مورد آنالیز بارکدینگ DNA و ژن COI قرار دادند که علاوه بر هدف اول بارکدینگ یعنی تعیین هویت گونه‌ها نشانه‌های تاکسونومیک مبنی بر تفکیک چهار کلاستر مجزای teleosts، chimaerids, rays, sharks بر اساس روش Neighbour Joining به دست آمد.

در سال ۲۰۱۴، بیلگین و همکاران ۱۲ گونه میگوی سواحل مدیترانه و دریاهای ترکیه را با توالی یابی ژن COI مورد آنالیز بارکدینگ DNA قرار دادند.

در سال ۲۰۱۵، در تحقیق بارکدینگ انجام شده بر روی میگو، راج کومار و همکاران با غربالگری فنوتیپی ۱۴ گونه میگو از سواحل هندوستان درنهایت شش گونه *P. semisulcatus, M. dobsoni, M. brevicornis, F. indicus, P. stylifera, S. crassicornis* با استفاده از توالی یابی قطعه ۶۵۰ جفت بازی ژن سیتوکروم اکسیداز مورد شناسایی و تعیین هویت مولکولی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بیشترین تفاوت بین گونه‌ای در *F. indicus* از هندوستان، تایلند و چین مشاهده می‌گردد. بیشترین تفاوت داخل گونه‌ای نیز بین *S. crassicornis* و *S. koelbeli* از هندوستان و چین گزارش گردید. کمترین تفاوت نیز بین *M. dobsoni* و *M. brevicornis* که دو هاپلوتایپ هندی می‌باشند مشاهده گردید.

۳- مواد و روش‌ها

۱-۳- نمونه‌گیری

از گونه‌های اقتصادی میگو و پرورشی بومی و غیربومی چندگونـه *L. vannamei*، *P. semisulcatus*، *F. merguiensis*، *M .affinis*، *Parap. Stylifera*، *F.indicus* انتخاب گردید. نمونه‌برداری از سـه اسـتان بوشـهر خوزسـتان و هرمزگـان صورت گرفت. نمونه‌ها طی جدول شماره ۲-۱ جمع‌آوری و مورد آزمایش قرار گرفتند.

۲-۱. جدول نمونه‌برداری از میگوی سفید غربی

ردیف	کد نمونه	نام نمونه	مکان نمونه‌برداری	تاریخ نمونه‌برداری	توضیحات
۰۱.	MG-B-91-001	*L. vannamei*	ایستگاه بندرگاه	۹۱/۱۱/۱	مولوکای
۰۲.	MG-B-91-002	*L. vannamei*	ایستگاه بندرگاه	۹۱/۱۱/۱	مولوکای
۰۳.	MG-B-91-003	*L. vannamei*	ایستگاه بندرگاه	۹۱/۱۱/۱	مولوکای
۰٤.	MG-B-91-004	*L. vannamei*	ایستگاه بندرگاه	۹۱/۱۱/۱	مولوکای
۰۵.	MG-B-91-005	*L. vannamei*	ایستگاه بندرگاه	۹۱/۱۱/۱	مولوکای
۰٦.	MG-B-91-006	*L. vannamei*	ایستگاه بندرگاه	۹۱/۱۱/۱	های‌هلث
۰۷.	MG-B-91-007	*L. vannamei*	ایستگاه بندرگاه	۹۱/۱۱/۱	های‌هلث
۰۸.	MG-B-91-008	*L. vannamei*	ایستگاه بندرگاه	۹۱/۱۱/۱	های‌هلث
۰۹.	MG-B-91-009	*L. vannamei*	ایستگاه بندرگاه	۹۱/۱۱/۱	های‌هلث
۰۱۰.	MG-B-91-010	*L. vannamei*	ایستگاه بندرگاه	۹۱/۱۱/۱	های‌هلث
۰۱۱.	MG-B-91-011	*L. vannamei*	ایستگاه بندرگاه	۹۱/۱۱/۱	Mix
۰۱۲.	MG-B-91-012	*L. vannamei*	ایستگاه بندرگاه	۹۱/۱۱/۱	Mix
۰۱۳.	MG-B-91-013	*L. vannamei*	ایستگاه بندرگاه	۹۱/۱۱/۱	Mix
۰۱٤.	MG-B-91-014	*L. vannamei*	ایستگاه بندرگاه	۹۱/۱۱/۱	Mix
۰۱۵.	MG-B-91-015	*L. vannamei*	ایستگاه بندرگاه	۹۱/۱۱/۱	Mix

۲-۲. جدول نمونه‌برداری از میگوی ببری سبز

ردیف	کد نمونه	نام نمونه	مکان نمونه‌برداری	تاریخ نمونه‌برداری	توضیحات
۱۶.	MG-B-92-016	*P. semisulcatus*	گناوه	۹۲/۶/۳	باندار
۱۷.	MG-B-92-017	*P. semisulcatus*	گناوه	۹۲/۶/۳	بدون باند
۱۸.	MG-B-92-018	*P. semisulcatus*	دیر	۹۲/۶/۴	باندار
۱۹.	MG-B-92-019	*P. semisulcatus*	دیر	۹۲/۶/۴	بدون باند
۲۰.	MG-B-92-020	*P. semisulcatus*	دیر	۹۲/۶/۴	بدون باند
۲۱.	MG-B-92-021	*P. semisulcatus*	بوشهر	۹۲/۶/۵	باندار
۲۲.	MG-B-92-022	*P. semisulcatus*	بوشهر	۹۲/۶/۵	باندار
۲۳.	MG-B-92-023	*P. semisulcatus*	بوشهر	۹۲/۶/۵	بدون باند

۲-۳. جدول نمونه‌برداری از میگوی موزی

ردیف	کد نمونه	نام نمونه	مکان نمونه‌برداری	تاریخ نمونه‌برداری	توضیحات
۱	MG-B-92-024	*F. merguiensis*	بندرعباس	۹۲/۷/۱۵	موزی
۲	MG-B-92-025	*F. merguiensis*	بندرعباس	۹۲/۷/۱۵	موزی
۳	MG-B-92-026	*F. merguiensis*	بندرعباس	۹۲/۷/۱۵	موزی

۲-٤. جدول نمونه‌برداری از میگوی سرتیز

ردیف	کد نمونه	نام نمونه	مکان نمونه‌برداری	تاریخ نمونه‌برداری	توضیحات
۱	MG-B-92-027	*M. affinis*	خوزستان	۹۲/۸/۱۷	سرتیز
۲	MG-B-92-028	*M. affinis*	خوزستان	۹۲/۸/۱۷	سرتیز
۳	MG-B-92-029	*M. affinis*	خوزستان	۹۲/۸/۱۷	سرتیز
۴	MG-B-93-036	*M. affinis*	خوزستان	۹۴/۰۱/۲۲	سرتیز
۵	MG-B-93-037	*M. affinis*	خوزستان	۹۴/۰۱/۲۲	سرتیز
۶	MG-B-93-038	*M. affinis*	خوزستان	۹۴/۰۱/۲۲	سرتیز

۲-۵. جدول نمونه‌برداری از میگوی خنجری

ردیف	کد نمونه	نام نمونه	مکان نمونه‌برداری	تاریخ نمونه‌برداری	توضیحات
۱.	MG-B-92-030	Parap. stylifera	بوشهر	۹۲/۶/۱۰	خنجری
۲.	MG-B-92-031	Parap. stylifera	بوشهر	۹۲/۶/۱۰	خنجری
۳.	MG-B-92-032	Parap. stylifera	بوشهر	۹۲/۶/۱۰	خنجری

۲-۶. جدول نمونه‌برداری از میگوی سفید هندی

ردیف	کد نمونه	نام نمونه	مکان نمونه‌برداری	تاریخ نمونه‌برداری	توضیحات
۱.	MG-B-93-033	F.indicus	بندرعباس	۹۳/۱۲/۱۸	سفید هندی
۲.	MG-B-93-034	F.indicus	بندرعباس	۹۳/۱۲/۱۸	سفید هندی
۳.	MG-B-93-035	F.indicus	بندرعباس	۹۳/۱۲/۱۸	سفید هندی

۲-۳- استخراج DNA

DNA ژنومی با استفاده از کیت " استخراج DNA ژنومی جنرال تاپ" (شرکت توپاز ژن، شماره کاتالوگ TGK1003) استخراج شد. مراحل استخراج به شرح زیر انجام شد.

۱- ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت گوشتی میگو بریده شد و در داخل هاون چینی با ازت مایع پودر شد و درون تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری استریل ریخته شد.

۲- ۲۰۰ µl از بافر TL را روی بافت له‌شده ریخته و ورتکس شد تا بافت به‌صورت سوسپانسیون شود سپس به مدت ۶۰ دقیقه در بن ماری $60^{o}C$ گرمخانه‌گذاری شد.

۳- ۲۰۰ µl از بافر BL و ۲۵ µl از محلول ۲۰mg/ml پروتئیناز K روی سوسپانسیون ریخته شد و بلافاصله با ورتکس به‌خوبی مخلوط شد. تیوب به مدت ۱۰ دقیقه داخل بن ماری $70^{o}C$ قرار داده شد.

۴- ۲۰۰ µl اتانول خالص به محلول فوق افزوده شده و تیوب ۸-۵ مرتبه سروته و به مدت ۶-۵ ثانیه ورتکس شد. در این مرحله محلول کاملاً همگن و شفاف به دست آمد.

۵- تمام محلول داخل ستونی که در داخل کالکشن تیوب ۲ ml قرار داده شد ریخته شده و به مدت ۱ دقیقه در x .۱۱۰۰۰g سانتریفیوژ شد. محلول داخل تیوب (عبور کرده از فیلتر) را دور ریخته و ستون مجدداً داخل تیوب ۲ ml قرار داده شد.

۶- ۷۰۰ µl از بافر BW1 داخل ستون ریخته و به مدت ۱ دقیقه در .x g ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول داخل تیوب (عبور کرده از فیلتر) را دور ریخته و ستون مجدداً داخل تیوب ۲ ml قرار داده شد.

۷- ۵۰۰ µl از بافر BW2 داخل ستون ریخته شد و به مدت ۳ دقیقه در .x g ۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول داخل تیوب (عبور کرده از فیلتر) را دور ریخته و ستون مجدداً داخل تیوب ۲ ml قرار داده شد.

۸- ستون خالی بدون محلول به مدت ۱ دقیقه در ۱۶۰۰۰ x g. سانتریفیوژ شد. ستون را از درون کالکشن تیوب خارج کرده و تیوب دور انداخته شد.

۹- ستون داخل یک تیوب ۱/۵ ml استریل قرار داده شد و ۵۰ µl از محلول EB روی ستون ریخته شده و به مدت ۲-۱ دقیقه اینکوبه شد. ستون به مدت ۱ دقیقه در ۱۱۰۰۰ x g. سانتریفیوژ شد.

۱۰- DNA استخراج شده برای انجام مراحل بعدی در فریزر ۲۰°C- نگهداری شد.

۳-۳- بررسی کمی و کیفی DNA ژنومی استخراج شده

به دو روش الکتروفورز روی ژل آگارز و اسپکتروفوتومتری انجام شد:

۳-۳-۱- الکتروفورز

ژل آگارز جهت انجام الکتروفورز به روش زیر آماده شد.

۱- بافر **TAE 50 X** طبق فرمول زیر تهیه شد و برای تهیه بافر **TAE 1X**، به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق شد.

TAE 50X	
Tris - base	243 g/lit
EDTA	50 mM (pH = 8)
Glacial acetic acid	5.71 % (V/V)
TAE 1X	
TAE 50X	1 ml
Dionized water	49 ml

۲- ۱ گرم پودر آگارز در ۱۰۰ میلی‌لیتر TAE 1X حرارت داده شده و حل شد، محلول ژل داخل قالب ریخته شد.

۳- بعد از بسته شدن، ژل را از قالب خارج کرده و داخل تانک الکتروفورز قرار داده شد. بافر تانک TAE 1X روی آن ریخته و شانه از ژل بیرون کشیده شد.

۴- نمونه‌های DNA به نسبت ۵ µl به ۱ µl با بافر بارگذاری 6x مخلوط شده و در چاهک‌های ژل لود شد.

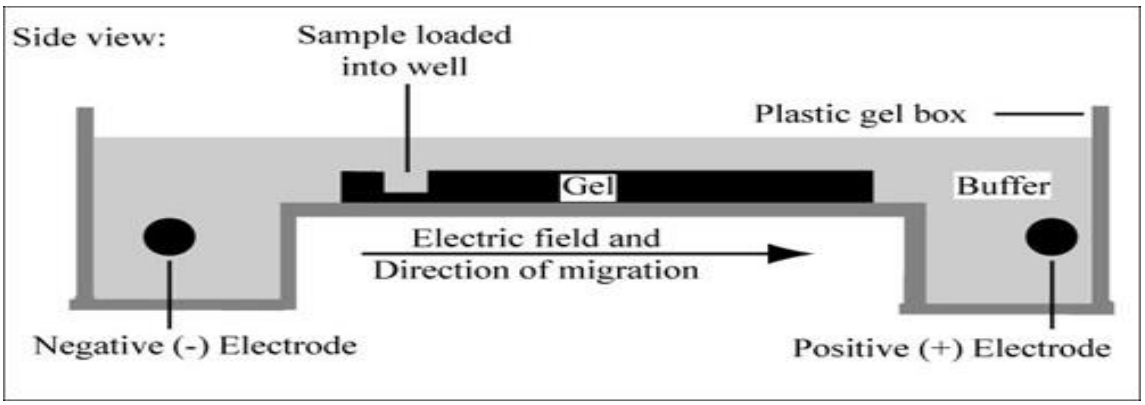
۵- تانک الکتروفورز را به منبع تغذیه وصل شد.

۶- ولتاژ دستگاه در حدود ۱۰۰V- ۸۵ تنظیم شد.

۷- وقتی رنگ نشانه سه‌چهارم طول ژل را طی کرد ژل از تانک خارج شده و در محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۵ mg/ml قرار داده شد. پس از گذشت ۱۰- ۵ دقیقه ژل از محلول رنگ خارج شده و با آب شسته شد.

۸- ژل در دستگاه ژل داک مشاهده شد.

Gel casting



۲-۳-۳- اسپکتروفوتومتری

۳ µ از محلول DNA استخراج شده درون دستگاه پیکو دراپ قرار داده شده و میزان جذب نوری آن را در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت این دو و نیز غلظت DNA های استخراج شده قرائت شد.

٤-۳- انجام واکنش PCR

جهت تکثیر ژن میتوکندریایی، سیتوکروم C اکسیداز زیر واحد ۱(CO1) با طول تقریباً ۷۱۰ جفت باز، از «مستر میکس PCR تاپ» (شرکت توپاز ژن، شماره کاتالوگ TGP3003) و پرایمرهای استاندارد معرفی شده توسط کنسرسیوم جهانی بارکدینگ استفاده شد.

توالی آغازگرها به شرح ذیل است:

LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3
HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3

برنامه PCR به شرح زیر انجام شد.

واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل، واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و طویل سازی رشته DNA دردمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در خاتمه یک چرخه ۱۰ دقیقه بسط تکمیلی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

ترکیب واکنش PCR به شرح زیر انجام شد.

Template DNA	50 ng
Top PCR master mix (2X)	25 µl
Primers	1 µl (each)
Water	Up to 50 µl

محصول PCR متعاقب الکتروفورز روی ژل آگارز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مشاهده شد.

۳-۵- تخلیص محصول PCR

قطعه تکثیر شده از ژن سیتوکروم اکسیداز توسط " کیت تخلیص محصول PCR تاپ " (شرکت توپاز ژن، شماره کاتالوگ TGK1007) به شرح زیر تخلیص شد.

۱- به کل حجم واکنش PCR ۵ برابر بافر PPB اضافه شد.

۲- ستون سیلیکا درون کالکشن تیوپ ۲ml قرار گرفت.

۳- تمام محلول داخل ستون ریخته شده و ۱ دقیقه در.g× ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد و محلول داخل تیوپ دور ریخته شد و ستون مجدداً درون تیوپ قرار داده شد.

۴- ۷۰۰ µl از بافر PPW درون ستون ریخته شد و ۱ دقیقه در.g × ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول داخل تیوپ دور ریخته شد و ستون مجدداً درون تیوپ قرار داده شد.

۵- ستون خالی ۱ دقیقه در.g × ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد و محلول داخل تیوپ و تیوپ ا دور انداخته شد.

۶- ستون درون یک تیوپ ۱/۵ ml استریل قرار داده شد و ۵۰ µl بافر EB روی ستون ریخته و به مدت ۲-۱ دقیقه اینکوبه شد. ستون ۱ دقیقه در.g × ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد.

۷- DNA استخراج شده برای مراحل بعدی آزمایش در دمای $۲۰^{o}C$- نگهداری شد.

۳-۶- کنترل کیفی محصول PCR تخلیص شده

- با استفاده از دستگاه پیکودراپ کمیت و کیفیت DNA را بررسی شد.

- ۱ میکرولیتر از محصول تخلیص شده PCR روی ژل الکتروفورز آگارز ۱٪ لود شده و ران شد.

۳-۷- کلونینگ ژن

۳-۷-۱- انجام واکنش الحاق

واکنش الحاق توسط کیت **T/A** کلونینگ شرکت فرمنتاز به شرح زیر انجام شد.

۱- محلول واکنش طبق پروتکل زیر آماده شد.

Component	***volume***
Vector $p^{TZ57R/T,}$ (0.17 pmol ends)	3 µl
5X ligation buffer	6 µl
PCR product (0.52 pmol ends)	variable
T4 DNA Ligase	1 µl
Water, nuclease free	Up to 30 µl
Total volume	***30 µl***

به‌منظور محاسبه دقیق و دستیابی به مقدار مطلوب ۰/۵۲ pmol از انتهای آزاد دو رشته محصول PCR از رابطه زیر استفاده شد.

$$\text{pmol of ends } (0.52) = 2 \times 10^6 \times \mu g \text{ of dsDNA} / N(bp) \times 660$$

N: تعداد نوکلئوتیدهای قطعه سنتز شده

۲- بعد از تهیه مخلوط الحاق، به‌طور مختصر ورتکس و حدود ۵-۳ ثانیه سانتریفیوژ شد.

۳- محلول واکنش به مدت ۱ ساعت در دمای ^oC ۲۲ اینکوبه شد. برای دستیابی به بهترین نتیجه محلول واکنش به مدت یک شب در دمای ^oC۴ اینکوبه شد.

۴- ۲/۵ µl از محلول واکنش برای ترانسفورماسیون استفاده شد.

۲-۷-۳- تهیه سلول‌های مستعد

آماده‌سازی سلول‌های باکتری میزبان برای جذب مولکول **DNA** نوترکیب خارجی با تیمار باکتری‌ها در محلول کلرید کلسیم انجام شد.

۱-۱-۷-۳- مواردی که قبل از شروع کار انجام گرفت

۱- تهیه استوک باکتری E.coli DH5α

۲- تهیه محیط کشت باکتری و استریل آن

۳- تهیه محلول‌های لازم و استریل کردن آن‌ها و نگهداری آن‌ها در یخچال

۵- قرار دادن ۳۰ - ۲۵ عدد میکروتیوب ۱/۵ml استریل در فریزر ^oC۸۰-

۲-۱-۷-۳- محلول‌های لازم برای تهیه سلول‌های مستعد باکتریایی و نیز نگهداری آن‌ها

Competent cell preparation solution
$CaCl_2$ 100mM
Storage Solution
$CaCl_2$ (100 mM) 80%
Glycerol 20%

محلول‌های فوق را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ^oC۱۲۱ اتوکلاو شد.

۳-۱-۷-۳- محیط کشت باکتری E.coli

محیط کشت مناسب باکتری E.coli محیط LB است.

مواد لازم برای تهیه این محیط و نیز نحوه آماده‌سازی آن به شرح زیر است.

Luria Bertani medium (pH=7)
-Bacto-Tryptone 10.0 g/lit
-Bacto-Yeast extract 5.0 g/lit
-NaCl 10.0 g/lit

به‌منظور تهیه محیط جامد g/lit ۱۵ پودر آگار به مواد فوق افزوده شد. قبل از افزودن آگار pH تنظیم شد. محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ^{o}C ۱۲۱ اتوکلاو شد.

٤-۱-۷-۳- سلول‌های مستعد (Competent Cell) به روش زیر تهیه شد.

۱- یک استوک باکتری E.coli DH5α از فریزر ^{o}C ۸۰- خارج شده و روی یخ قرار داده شد تا به آرامی ذوب شود.

۲- به میزان µl ۲۰-۱۰ از استوک در ml ۵ محیط کشت LB تلقیح شده و به مدت یک شب در شیکر انکوباتور در دمای ^{o}C ۳۷ و rpm ۲۰۰ اینکوبه شد.

۳- رقت ۱/۲۵ از کشت باکتری تهیه شد: حدود ml۲/۵ از کشت شبانه در داخل ml ۵۰ محیط کشت مایع استریل LB تلقیح شده در شیکر انکوباتور در دمای ^{o}C ۳۷ و rpm۲۰۰ به مدت ۳- ۲ ساعت اینکوبه شد تا زمانی که به OD_{600}=0.6 رسید.

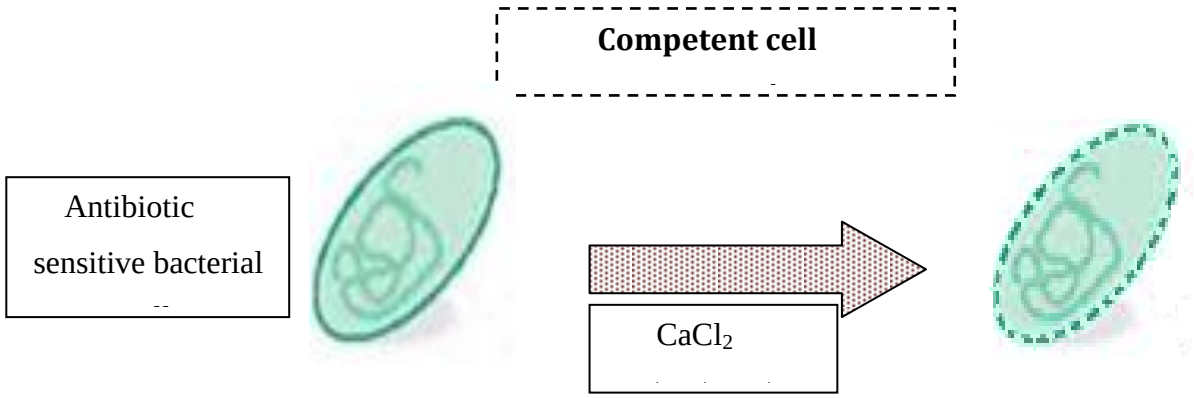
۶- محتویات ارلن به‌طور مساوی در ۲ فالکون استریل تقسیم شد (هر فالکون ml۳۰- ۲۵)

۷- فالکن‌های حاوی باکتری کشت شده در دمای ^{o}C ۴ و rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.

۸- تحت شرایط کاملاً استریل سوپرناتانت دور ریخته شد. رسوب حاصل در ml ۲۵ (۱۰۰mM) $CaCl_2$ سرد به آرامی حل شده و به مدت ۴۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد.

۹- فالکن‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت دور ریخته شد.

۱۰-رسوب حاصل در ml ۴ از محلول (گلیسرول ۲۰% + ٪۸۰$CaCl_2$ (100 mM)) سوسپانسیون شده و درون میکرو تیوب‌های ml۱/۵ استریل سرد (هر تیوب µl ۲۰۰) ریخته و در فریزر ^{o}C ۸۰- قرار داده شد.



۳-۷-۳- تهیه محیط کشت انتخابی

محیط کشت انتخابی برای غربال کلونی‌های سفیدآبی به روش زیر ساخته شد.

۱- محیط کشت LB آگار (شرکت chem lab) طبق پروتکل درج شده بر روی جعبه ساخته و اتوکلاو شد.

۲- محلول آمپی‌سیلین به غلظت ۱۰۰ mg/ml تهیه نمایید. (۱۰۰ میلی‌گرم از پودر آمپی‌سیلین وزن شده و درون تیوب استریل ml ۱/۵ ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل روی آن ریخته شده و با ورتکس حل شد.) محلول در یخچال قرار داده شد.

۳- محلول IPTG به غلظت M ۰/۱ تهیه نمایید.(mg ۲۳/۸۳ از پودر IPTG (شرکت فرمنتاز) در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد.) محلول در یخچال نگهداری شد.

۴- محلول X-Gal تهیه شد. (mg ۲۰ از پودر X-Gal (شرکت فرمنتاز) در ۱ میلی‌لیتر حلال دی متیل سولفوکساید و یا دی متیل فرمامید حل شد.) محلول در مکانی دور از نور و در دمای ^{o}C ۲۰- نگهداری شد.

۵- هنگامی‌که دمای محیط کشت به^{o}C ۵۰ رسید در زیر هود از محلول آنتی‌بیوتیک تهیه شده مقدار µl/ml ۱ از محلول آمپی‌سیلین به محیط‌ها اضافه‌شده و به‌خوبی مخلوط شد.

۶- محیط کشت LB آگار در بلیت‌های استریل در زیر هود و تحت شرایط استریل پخش شده و سرد شد.

۷- µl ۱۰۰ محلول IPTG روی پلیت ریخته شد و با استفاده از یک پیپت پاستور استریل به‌خوبی پخش و خشک شد.

۸- µl ۴۰ از محلول X-Gal روی پلیت ریخته شد و به‌خوبی پخش شد.

٤-۷-۳- ترانسفورماسیون

انتقال DNA نوترکیب به درون سلول‌های مستعد از طریق شوک حرارتی و به روش زیر صورت گرفت

۱- ۱ ویال حاوی سلول‌های مستعد DH5α آماده شده از قبل از فریزر ^{o}C ۸۰- خارج شده و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد تا کاملاً ذوب شود.

۲- µl۱۰- ۵ از مخلوط واکنش الحاق به سلول‌های مستعد ذوب شده افزوده و به آرامی مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. در طول این مدت بن ماری روشن شده و روی ^{o}C ۴۲ تنظیم شد.

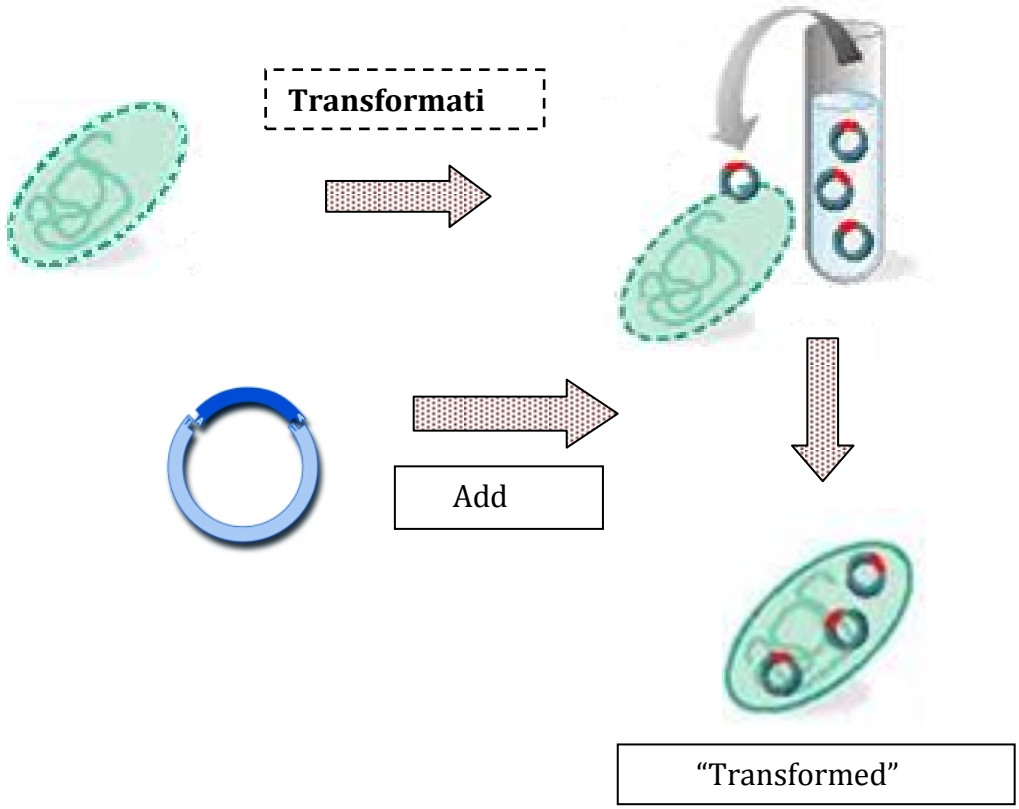
۳- تیوب‌ها از یخ خارج شده و بلافاصله درون بن ماری ^{o}C ۴۲ به مدت ۲ دقیقه قرار داده شد.

٤- تیوب‌ها بعد از آن به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار داده شد.

۵- مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB به محتویات ویال اضافه شده و به مدت ۱ ساعت در دمای ^{o}C ۳۷ اینکوبه شد.

۶- محتویات ویال روی پلیت حاوی محیط کشت انتخابی ریخته شده و با پیپت پاستور به خوبی پخش شد

۹- پلیت در دمای ^{o}C ۳۷ به مدت یک شب اینکوبه شد.



۵-۷-۳- غربال و کشت باکتری نوترکیب

بعد از گذشت ۱۶- ۱۲ ساعت و ظهور کلونی‌ها در پلیت کشت شده، ۳ نوع کلونی متفاوت به رنگ‌های سفید، آبی و آبی کمرنگ مشاهده شد. کلونی‌های سفید کلونی‌های تراریخت با وکتور نوترکیب هستند. در بعضی موارد ممکن است به دلیل کوچک بودن DNA خارجی و یا عدم دگرگونی در ساختار قرائت ژن 'lacZ، آنزیم نیمه فعالی تولید شده و کلونی‌هایی به‌صورت آبی کمرنگ ظاهر گردند. در صورت عدم وجود کلونی‌های سفید، احتیاطاً می‌توان از این نوع کلونی‌ها برای ردیابی وکتور نوترکیب استفاده نمود. در بیشتر موارد کلونی‌های کمرنگ در صورت چند ساعت نگهداری در یخچال رنگ اصلی خود را باز می‌یابند. در این مرحله چند کلونی سفید انتخاب شده و در محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین کشت شدند.

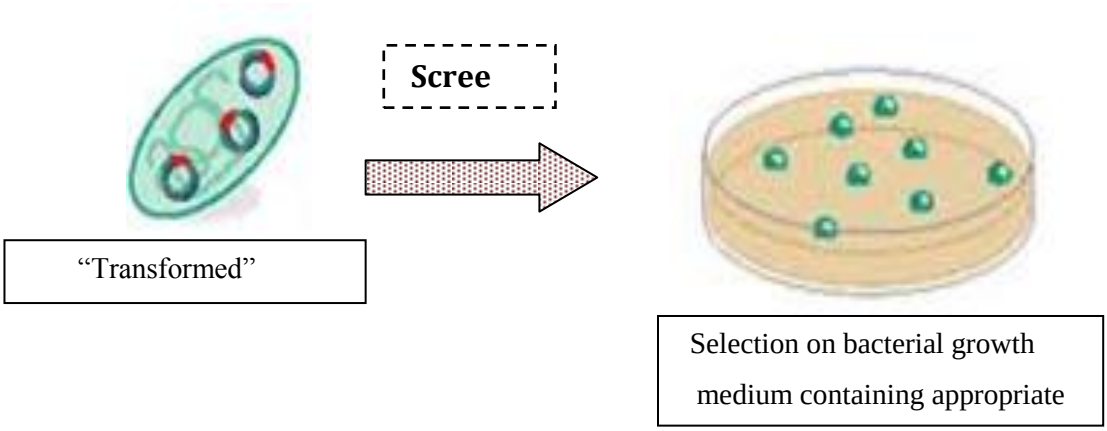
انتخاب کلونی نوترکیب و کشت آن در محیط حاوی آمپی‌سیلین به روش زیر صورت گرفت.

۱- محیط کشت LB مایع حاوی آمپی‌سیلین از یخچال بیرون آورده شده و در زیر هود میکروبیولوژی در شرایط کاملاً استریل به میزان ۳-۵ml داخل فالکون ۱/۵ml استریل ریخته شد.

۱- یک کلونی سفید انتخاب شده و در فالکون حاوی محیط کشت انتخابی کشت شد.

۲- فالکون‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای $37\ ^{o}C$ درون شیکر انکوباتور با ۲۰۰rpm اینکوبه شد.

۳- دور پلیت باکتری با پارافیلم پوشانده و در یخچال نگهداری شد تا در صورت نیاز از این پلیت ها برای انتخاب باکتری‌های نوترکیب دیگر استفاده شود.



۸-۳- استخراج پلاسمید

استخراج پلاسمید با استفاده از " کیت استخراج پلاسمید تاپ" (شرکت توپاز ژن) و به روش زیر انجام شد.

۱- ml ۱/۵ از محیط کشت مایع کلونی سفید کشت داده شده OD_{A600} =0.5 داخل یک میکروتیوب استریل ریخته و با دور rpm ۱۲۰۰۰، به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی را دور ریخته شد. این مرحله بار دیگر تکرار شد.

۲- µl ۲۵۰ از بافر P1 به رسوب باکتری اضافه شده و مقدار µl ۲/۵ از محلول(RNase A (100 mg/ml به آن افزوده و به آرامی پایپت شد تا رسوب کاملاً حل شد.

۳- µl ۲۵۰ از بافر P2 به محلول اضافه شده و به آرامی با سروته کردن تیوب به تعداد ۸ -۶ بار کاملاً مخلوط شد. تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه اینکوبه شد.

۴- µl ۳۵۰ از بافر N3 به محلول اضافه شده و به آرامی با سروته کردن تیوب به تعداد ۸-۶ بار آن را کاملاً مخلوط شد. در این مرحله رسوب ابری شکلی تشکیل می‌شود تا تشکیل رسوب ابری شکل سروته کردن تیوب‌ها را ادامه داده شد.

۵- تیوب به مدت ۱۰ دقیقه با دور .g×۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا شده و درون ستون سیلیکا که درون تیوب ml ۲ قرار داشت ریخته شد.

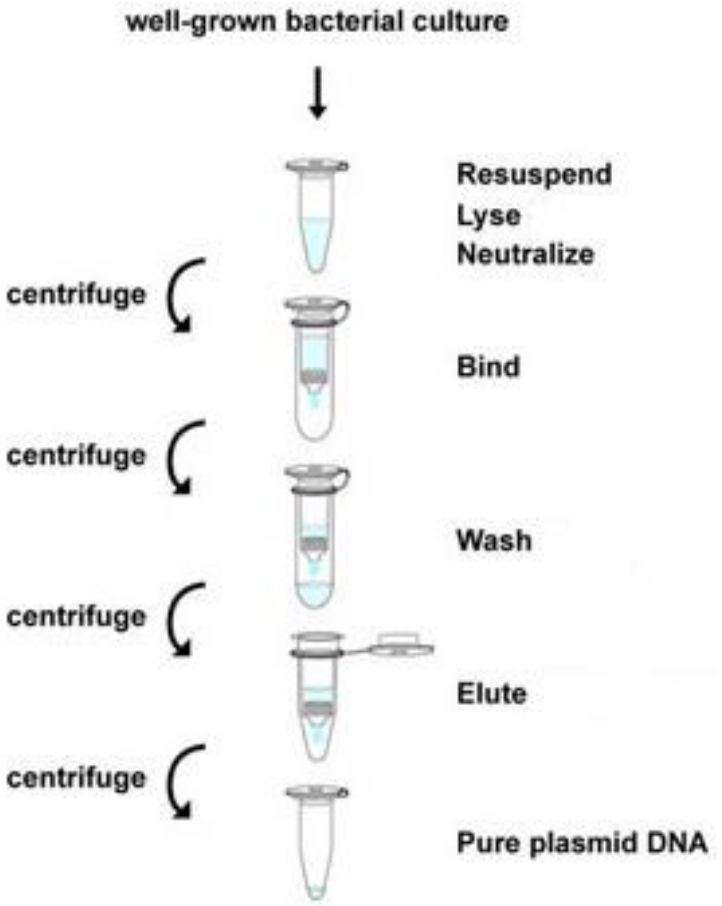
۶- تیوب به مدت ۱ دقیقه با دور .g×۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع درون تیوب دور ریخته شده و ستون مجدداً درون تیوب ml ۲ قرار داده شد.

۷- µl ۷۵۰ از بافر PW1 درون ستون ریخته شده و تیوب به مدت ۱ دقیقه با دور .g×۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع درون تیوب دور ریخته شد و ستون مجدداً درون تیوب ml ۲ قرار داده شد.

۸- ۷۵۰ µl از بافر PW2 درون ستون ریخته و تیوب به مدت ۱ دقیقه با دور .g×۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع درون تیوب دور ریخته شد و ستون مجدداً درون تیوب ۲ ml قرار داده شد.

۹- ستون خالی به مدت ۱ دقیقه با دور .g×۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. تیوب 2 ml دور انداخته شد و ستون درون یک تیوب ۱/۵ استریل قرار داده شد. ۵۰ µl از بافر EB به مرکز ستون ریخته و به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. تیوب به مدت ۱ دقیقه با دور .g×۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. DNA پلاسمیدی استخراج شده را در فریزر ۲۰°C- نگهداری شد.

Plasmid extraction



۹-۳- هضم آنزیمی استخراج پلاسمید

در این مرحله دو آنزیم برشی که جایگاه برشی آن‌ها بر روی جایگاه کلونینگ وکتور **pTZ57R/T** است انتخاب شد.

واکنش هضم آنزیمی به‌طور خلاصه به روش زیر انجام شد.

۱- مخلوط واکنش طبق پروتکل زیر تهیه شد.

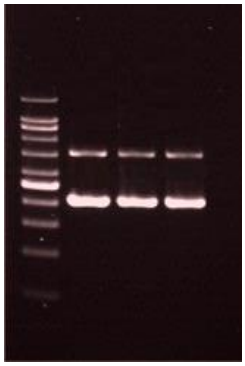
plasmid	**10 µl**
Buffer (R+)	**1.0 µl**
Buffer (Y+/Tango)	**1.0 µl**
Enzyme (Hind III)	**0.5 µl**
Enzyme (Sac I)	**0.5 µl**
Dionized water	**up to 20 µl**

۲- مخلوط واکنش به آرامی مخلوط شده و چند ثانیه سانتریفیوژ شد.

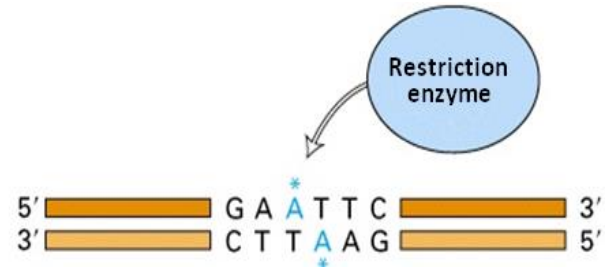
۳- ویال در دمای $37^{o}C$ به مدت ۱۲- ۳ ساعت اینکوبه شد.

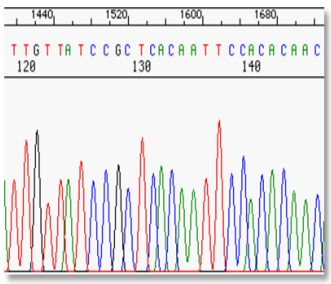
۴- محصول واکنش روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شده و رنگ‌آمیزی شد.

۵- الگوی باندی نتیجه نهایی را نشان داد.



Verificatio





۳-۱۰- توالی یابی

در این مرحله مابقی پلاسمید استخراج شده نمونه‌هایی که محصول الگوی برشی آن‌ها تائید کننده وجود قطعه ۷۱۰ جفت بازی مورد نظر بود جهت توالی یابی دو طرفه به روش سنگر از طریق شرکت فزاپژوه به کشور آمریکا ارسال گردید.

۳-۱۱- آنالیز بیوانفورماتیک

در این مرحله بعد از دریافت نتایج توالی یابی در دو فرمتab1. (به‌عنوان فایل کروماتوگراف) وseq. (به‌عنوان فایل خام توالی یابی) برای هر نمونه آنالیز و عملیات بیوانفورماتیکی صورت گرفت. در ابتدا برای حصول به توالی خالص خود ژن سیتوکروم اکسیداز، توالی خام توسط نرم‌افزار اینترنتی VecScreen از توالی وکتور پاک‌سازی گردیده و سپس جهت همگذاری (Assembling) از نرم‌افزار اینترنتی bl2seq استفاده گردید. در نهایت بعد از مکمل و معکوس کردن یکی از خوانش ها و حذف قسمت همپوشان توالی کامل دو بار قرائت شده‌ای برای هر نمونه حاصل گردید.

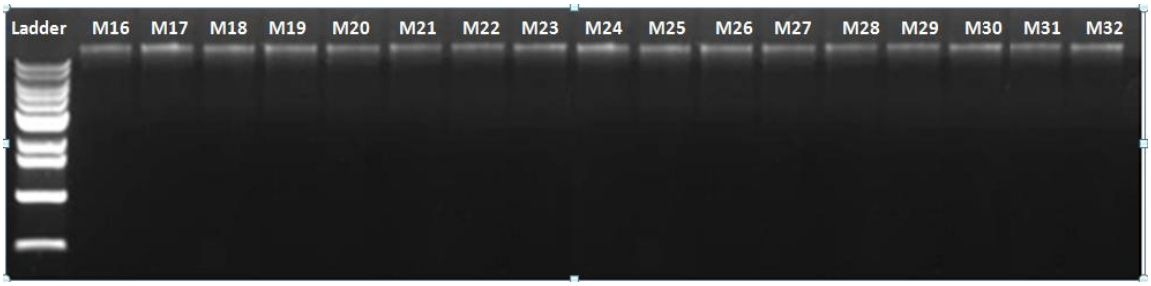
سپس طبق استانداردهای اعلامی کنسرسیوم بارکدینگ توالی‌ها به طریق دستی کنترل کیفی گردید. به‌این‌ترتیب که با آنالیز کروماتوگراف یا پیک‌های توالی یابی مربوط به هر نمونه با نرم‌افزار Chromas در الگویی هم‌زمان با چک کردن با پایگاه داده‌ها نوکلئوتیدهای با رزولوشن نامشخص و یا وزن پیک کمتر مورد بررسی مجدد قرار گرفتند.

در آخرین مرحله با تعریف پروژه مربوطه در ماشین آنالیز CBOL بارکد هر توالی و طبقه‌بندی فیلوژنتیک هر نمونه مشخص گردید.

٤-نتایج

٤-١- استخراج DNA

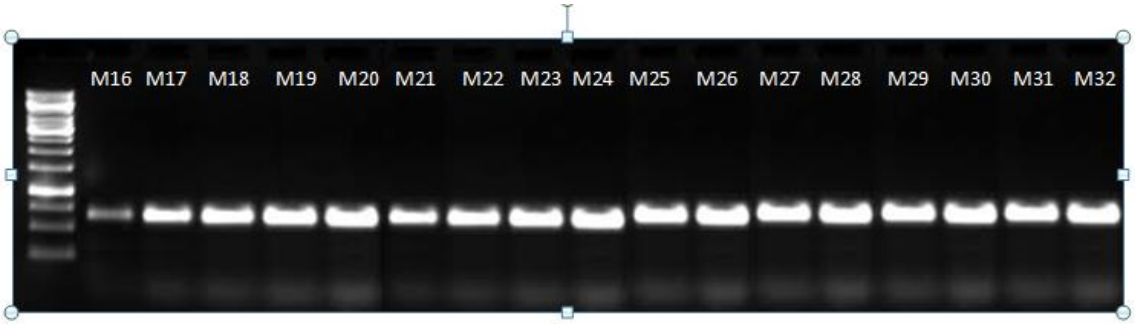
DNA از تمام نمونه‌ها در مقدار مناسب و کیفیت مناسب **A260/A280 ≥ 1.7** جهت انجام **PCR** استخراج شد.



شکل ۳-۱- ژل الکتروفورز آگارز ۱٪، ۲ میکرو لیتر از هر نمونه استخراج شده بر روی ژل لود شد.

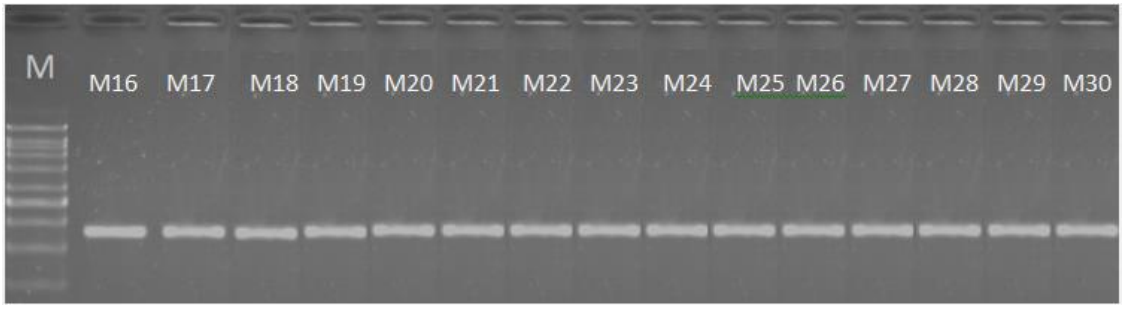
٤-٢- تکثیر ژن سیتوکروم اکسیداز

قطعه‌ای به طول ۷۱۰ جفت باز در تمام نمونه‌ها تکثیر شد.



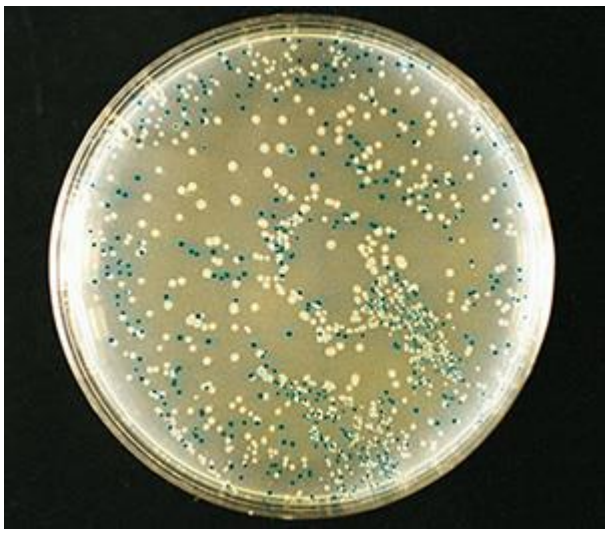
شکل ۳-۲- ۵ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه بر روی ژل الکتروفورز ۱٪ ران شد. سایز مارکر 1kb (شرکت فرمنتاز) است.

۳-٤ – تخلیص محصول PCR



شکل ۳-۳- ۲ میکرولیتر از محصول PCR تخلیص شده بر روی ژل آگارز ۱٪ ران شد.

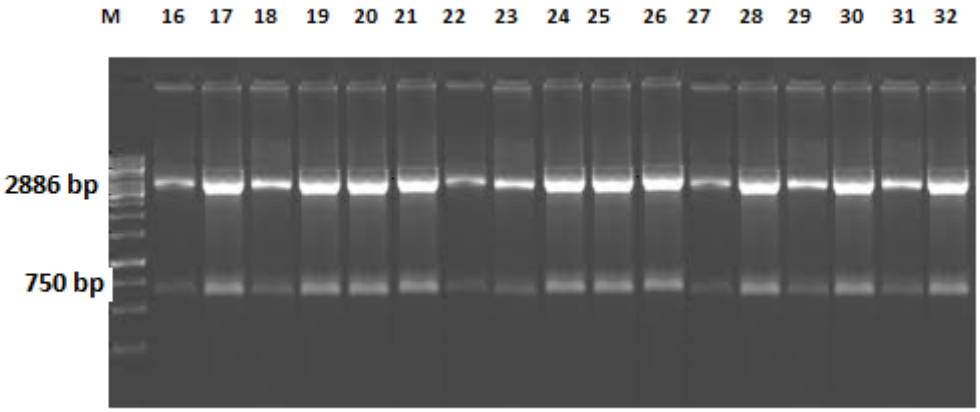
٤-٤- کلونینگ ژن سیتوکروم اکسیداز



شکل ۳-٤- غربال کلونی‌های نوترکیب در محیط کشت انتخابی

٥-٤- استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی

پلاسمید حامل ژن سیتوکروم اکسیداز از باکتری‌های تراریخت استخراج شده و با دو آنزیم **HindIII** و **SacI** برش داده شد.

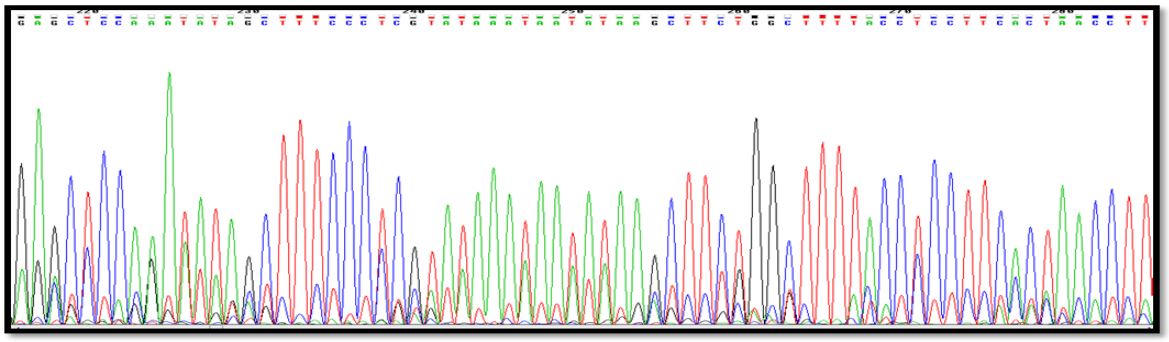


شکل ۳-۵- نتایج هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۱٪.

۱۰ میکرولیتر محصول واکنش هضم آنزیمی بر روی ژل الکتروفورز آگارز ۱٪ ران شد. نتیجه هضم آنزیمی قطعه‌ای به طول تقریبی ۷۳۰ جفت باز و وکتور pTZ57RT به طول ۲۸۸۶ جفت باز بود.

٦-٤-توالی یابی

نتایج توالی یابی به‌صورت فایل‌های notepad و abI برای همه نمونه‌ها به دست آمد. شکل ۳-۶ قسمتی از فایل abI مزبور یکی از توالی‌های نوکلئوتیدی قرائت شده را نشان می‌دهد.



شکل ۳-٦- بخشی از فایل abI توالی نوکلئوتیدی ژن سیتوکروم اکسیداز I تکثیر شده نمونه‌های میگو.

۷-٤- نتایج آنالیز شده بارکدهای DNA میگو

بعد از حذف توالی وکتور و نواحی همپوشان قرائت‌های هر نمونه، تصحیح نوکلئوتیدی‌ها بر اساس پیک کروماتوگرام و بررسی صحت توالی اسیدآمینه‌ای هر بارکد، توالی DNA بارکد نمونه‌ها به دست آمد. میزان تشابه هر نمونه با پایگاه داده‌های NCBI و CBOL بررسی و نزدیک‌ترین گونه به نمونه مورد بررسی مشخص شد. در زیر میزان تشابه هر نمونه با گونه‌های مشابه برای هر به تفکیک آمده است.

نمونه شماره ۱

جدول ۱- میزان شباهت نمونه شماره ۱ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.8	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private

نمونه شماره ۲

جدول ۲- میزان شباهت نمونه شماره ۲با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.54	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.43	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.4	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.4	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.4	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.38	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.37	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.24	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.23	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.23	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.23	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.23	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.22	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.22	Private

نمونه شماره ۳

جدول ۳- میزان شباهت نمونه شماره ۳با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity(%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.7	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.7	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.7	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.57	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.4	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.39	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.38	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.38	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.38	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.38	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.38	Private

نمونه شماره ٤

جدول ٤- میزان شباهت نمونه شماره ٤ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.8	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private

نمونه شماره ۵

جدول ۵- میزان شباهت نمونه شماره ۵ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.8	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private

نمونه شماره ٦

جدول ٦- میزان شباهت نمونه شماره ٦ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.7	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.4	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.4	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.39	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.39	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.39	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.38	Private

نمونه شماره ۷

جدول ۷- میزان شباهت نمونه شماره ۷ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*vannamei*	99.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*vannamei*	99.82	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.8	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private

نمونه شماره ۸

جدول ۸-میزان شباهت نمونه شماره ۸ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده **BOLD system**

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.68	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.53	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.53	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.4	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.4	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.4	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.38	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.29	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.21	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.1	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.08	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.08	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.08	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.07	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.07	Private

نمونه شماره ۹

جدول ۹- میزان شباهت نمونه شماره ۹با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده **BOLD system**

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.84	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.57	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.55	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.55	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.55	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.54	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.53	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.53	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.25	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.24	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.23	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.23	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.23	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.23	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.22	Private

نمونه شماره ۱۰

جدول ۱۰- میزان شباهت نمونه شماره ۱۰ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity(%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.54	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.54	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.54	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.53	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*vannamei*	99.51	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*vannamei*	99.5	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*vannamei*	99.46	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.41	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.39	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.39	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.39	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.39	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.39	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.38	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.38	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.38	Private

نمونه شماره ۱۱

جدول ۱۱- میزان شباهت نمونه شماره ۱۱ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private

نمونه شماره ۱۲

جدول ۱۲- میزان شباهت نمونه شماره ۱۲ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private

نمونه شماره ۱۳

جدول ۱۳- میزان شباهت نمونه شماره ۱۳ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.85	Private

نمونه شماره ١٤

جدول ١٤- میزان شباهت نمونه شماره ١٤ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.69	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.55	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.55	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.55	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.43	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.39	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.39	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.39	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.38	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.38	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.38	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.38	Private

نمونه شماره ١٥

جدول ١٥- ميزان شباهت نمونه شماره ١٥ با نزديک‌ترين گونه‌ها در پايگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.62	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.61	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.61	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.61	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.61	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.61	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.59	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.58	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.42	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	99.41	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	98.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	98.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	98.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*vannamei*	98.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	98.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Litopenaeus*	*vannamei*	98.83	Private

نمونه شماره ١٦

جدول ١٦- ميزان شباهت نمونه شماره ١٦ با نزديک‌ترين گونه‌ها در پايگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	100	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.82	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.82	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.82	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.82	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.8	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.66	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.63	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.63	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.63	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.63	Private

نمونه شماره ۱۷

جدول ۱۷- میزان شباهت نمونه شماره ۱۷ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	87.09	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	87.06	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	87.06	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	86.89	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	86.41	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*esculentus*	86.25	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	86.2	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*esculentus*	86.08	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*esculentus*	86.08	Early-Release

نمونه شماره ۱۸

جدول ۱۸- میزان شباهت نمونه شماره ۱۸ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	100	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	100	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.82	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.82	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.82	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.82	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.8	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.66	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.64	Private

نمونه شماره ۱۹

جدول ۱۹-میزان شباهت نمونه شماره ۱۹با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	87.09	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	87.06	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	87.06	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	86.89	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	86.41	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*esculentus*	86.25	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	86.2	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*esculentus*	86.08	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*esculentus*	86.08	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	85.92	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*esculentus*	85.92	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Farfantepenaeus*	*paulensis*	85.88	Published

نمونه شماره ۲۰

جدول ۲۰- میزان تشابه نمونه شماره ۲۰ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.62	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.59	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.43	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.43	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.43	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.43	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.43	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.38	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.3	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.24	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.24	Private

نمونه شماره ۲۱

جدول ۲۱- میزان تشابه نمونه شماره ۲۱ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.81	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.8	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.62	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.62	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.62	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.62	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.62	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.59	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Penaeus*	*semisulcatus*	99.48	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	99.44	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	99.44	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	99.44	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	99.39	Published

نمونه شماره ۲۲

جدول ۲۲- میزان تشابه نمونه شماره ۲۲ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	87.31	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	87.27	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	87.27	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	87.1	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	86.6	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	86.39	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*esculentus*	86.1	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	86.1	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	86.1	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	86.1	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	85.98	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	85.98	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	85.98	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	85.97	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*indicus*	85.93	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	87.31	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	87.27	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	87.27	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	87.1	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Penaeus	*semisulcatus*	86.6	Early-Release

نمونه شماره ۲۳

جدول ۲۳- میزان تشابه نمونه شماره ۲۳ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	98.99	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	98.99	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	98.99	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	98.45	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.9	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.9	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.9	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.68	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.68	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.68	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.57	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.52	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.52	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.52	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.5	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*		95.19	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	95.19	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	95.16	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	95.16	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	95.02	Early-Release

نمونه شماره ۲٤

جدول ۲٤- میزان تشابه نمونه شماره ۲٤ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	98.69	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	98.69	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	98.69	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	98.45	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.49	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.49	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.49	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.28	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.28	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.28	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.17	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.12	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.12	Early-Release

نمونه شماره ۲۵

جدول ۲۵- میزان تشابه نمونه شماره ۲۵ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	98.82	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	98.82	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	98.82	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	98.27	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	96.72	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	96.72	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	96.72	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	96.5	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	96.5	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	96.5	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	96.39	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	96.33	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	96.33	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	96.33	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*merguiensis*	96.31	Early-

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
							Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*indicus*	95	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*indicus*	94.93	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Fenneropenaeus	*indicus*	94.93	Published

نمونه شماره ٢٦

جدول ٢٦- میزان تشابه نمونه شماره ٢٦ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*ensis*	90.3	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*ensis*	87.23	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*brevicornis*	86.24	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*endeavouri*	85.83	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*endeavouri*	85.83	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*endeavouri*	85.83	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*endeavouri*	85.83	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*endeavouri*	85.83	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.5	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.5	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.5	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.5	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.5	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.5	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.5	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.5	Private

نمونه شماره ۲۷

جدول ۲۷- میزان تشابه نمونه شماره ۲۷ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Metapenaeus	ensis	90.71	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*ensis*	87.23	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*brevicornis*	86.42	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*endeavouri*	86.17	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*endeavouri*	86.17	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*endeavouri*	86.17	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*endeavouri*	86.17	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*endeavouri*	86.17	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.31	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.31	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.31	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.31	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.31	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.31	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.31	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.31	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	85.31	Private

نمونه شماره ۲۸

جدول ۲۸- میزان تشابه نمونه شماره ۲۸ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	98.83	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	98.83	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	98.83	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	98.45	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.62	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.6	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.6	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.39	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.39	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.39	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.31	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.22	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.22	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.22	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*merguiensis*	96.2	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*		95.07	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	95.07	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	95.02	Published

نمونه شماره ۲۹

جدول ۲۹- میزان تشابه نمونه شماره ۲۹با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	93.44	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	93.44	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	93.44	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	93.44	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	93.26	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	93.26	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	93.09	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	93.09	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	93.09	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	93.09	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	93.09	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	93.09	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	93.09	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	93.09	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	93.09	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	92.91	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	92.91	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*coromandelica*	92.91	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	Parapenaeopsis	*stylifera*	92.89	Published

نمونه شماره ۳۰

جدول ۳۰- میزان تشابه نمونه شماره ۳۰ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	93.19	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	93.19	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	93.19	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	93.19	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	93	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	93	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	92.82	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	92.82	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	92.82	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	92.82	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	92.82	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	92.82	Published

نمونه شماره ۳۱

جدول ۳۱- میزان تشابه نمونه شماره ۳۱ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	93.12	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	93.12	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	93.12	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	93.12	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	92.95	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	92.95	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	92.77	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	92.77	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	92.77	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	92.77	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	92.77	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Parapenaeopsis*	*coromandelica*	92.77	Published

نمونه شماره ۳۲

جدول ۳۲- میزان تشابه نمونه شماره ۳۲ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*ensis*	90.09	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*ensis*	86.92	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*brevicornis*	85.9	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*endeavouri*	85.54	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*endeavouri*	85.54	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*endeavouri*	85.54	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*endeavouri*	85.54	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*endeavouri*	85.38	Early-Release
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Solenoceridae	*Hymenopenaeus*	*debilis*	84.82	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	84.81	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	84.81	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Metapenaeus*	*monoceros*	84.81	Private

نمونه شماره ۳۳

جدول ۳۳- میزان تشابه نمونه شماره ۳۳ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.66
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.66
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.66
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.66
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.66
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.66
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.52
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.49
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.49
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.49
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	*Penaeidae*	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.49

نمونه شماره ۳٤

جدول ۳٤- میزان تشابه نمونه شماره ۳٤ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.83	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.65	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.65	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.65	Published

نمونه شماره ۳۵

جدول ۳۵- میزان تشابه نمونه شماره ۳۵ با نزدیک‌ترین گونه‌ها در پایگاه داده BOLD system

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.81	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.81	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.81	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.81	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.81	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.81	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.81	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.81	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.81	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.81	Private
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.62	Published
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Penaeidae	*Fenneropenaeus*	*indicus*	99.62	Published

۸-٤- نزدیک‌ترین نمونه‌های شناخته شده از لحاظ تشابه مولکولی

جدول ۱۷: معرفی نزدیک‌ترین گونه‌ها با ۱۶ نمونه مطالعه شده بر اساس اطلاعات پایگاه داده BOLD system

SIMILARITY (%)	CLOSEST GENUS, SPECIES	SPECIMEN NO.
99.85	*Litopenaeus vannamei*	۱
99.85	*Litopenaeus vannamei*	۲
100	*Litopenaeus vannamei*	۳
99.85	*Litopenaeus vannamei*	۴
99.85	*Litopenaeus vannamei*	۵
100	*Litopenaeus vannamei*	۶
99.85	*Litopenaeus vannamei*	۷
99.69	*Litopenaeus vannamei*	۸
99.85	*Litopenaeus vannamei*	۹
99.54	*Litopenaeus vannamei*	۱۰
100	*Litopenaeus vannamei*	۱۱
100	*Litopenaeus vannamei*	۱۲
100	*Litopenaeus vannamei*	۱۳
100	*Litopenaeus vannamei*	۱۴
99.62	*Litopenaeus vannamei*	۱۵
100	*Penaeus semisulcatus*	۱۶
87.09	*Penaeus semisulcatus*	۱۷
100	*Penaeus semisulcatus*	۱۸

SIMILARITY (%)	CLOSEST GENUS, SPECIES	SPECIMEN NO.
87.09	*Penaeus semisulcatus*	۱۹
99.62	*Penaeus semisulcatus*	۲۰
99.81	*Penaeus semisulcatus*	۲۱
87.31	*Penaeus semisulcatus*	۲۲
98.99	*Fenneropenaeus merguiensis*	۲۳
98.69	*Fenneropenaeus merguiensis*	۲۴
98.82	*Fenneropenaeus merguiensis*	۲۵
90.3	*Metapenaeus ensis*	۲۶
90.71	*Metapenaeus ensis*	۲۷
98.83	*Fenneropenaeus merguiensis*	۲۸
93.44	*Parapenaeopsis coromandelica*	۲۹
93.19	*Parapenaeopsis coromandelica*	۳۰
93.12	*Parapenaeopsis coromandelica*	۳۱
90.09	*Metapenaeus ensis*	۳۲
99.83	*Fenneropenaeus indicus*	۳۳
99.83	*Fenneropenaeus indicus*	۳۴
99.81	*Fenneropenaeus indicus*	۳۵

۹-٤- محاسبه فواصل ژنتیکی

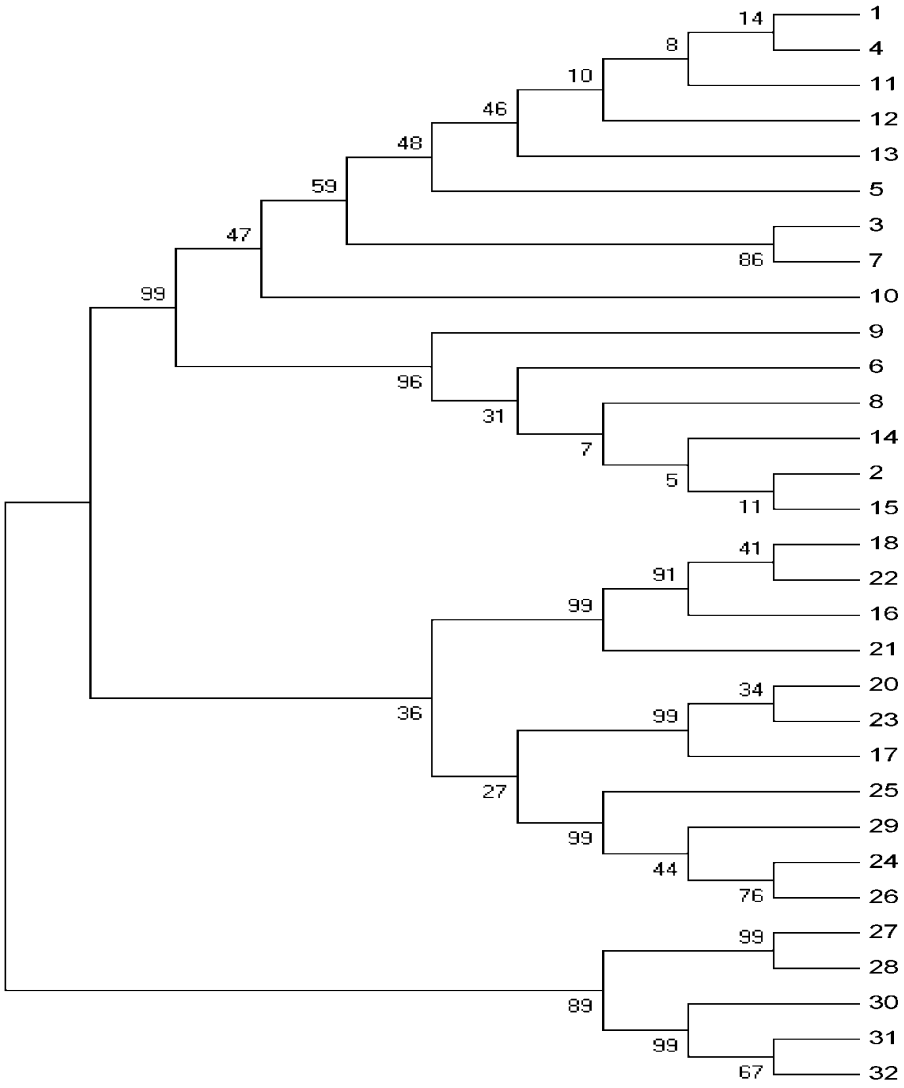
بر اساس امتیازدهی مبتنی بر تفاوت‌های نوکلئوتیدی جفت تاکسا فواصل ژنتیکی ۱۶ نمونه مورد مطالعه بر اساس امتیازدهی مبتنی بر تفاوت‌های نوکلئوتیدی جفت تاکسا با استفاده از آنالیز فواصل جفتی با نرم‌افزار **Mega 5.0** انجام گرفت که نتایج آن در جدول ذیل قابل مشاهده است.

جدول ۱۸: فواصل ژنتیکی ١٦ نمونه مورد مطالعه بر اساس امتیازدهی مبتنی بر تفاوت‌های نوکلئوتیدی جفت تاکسا

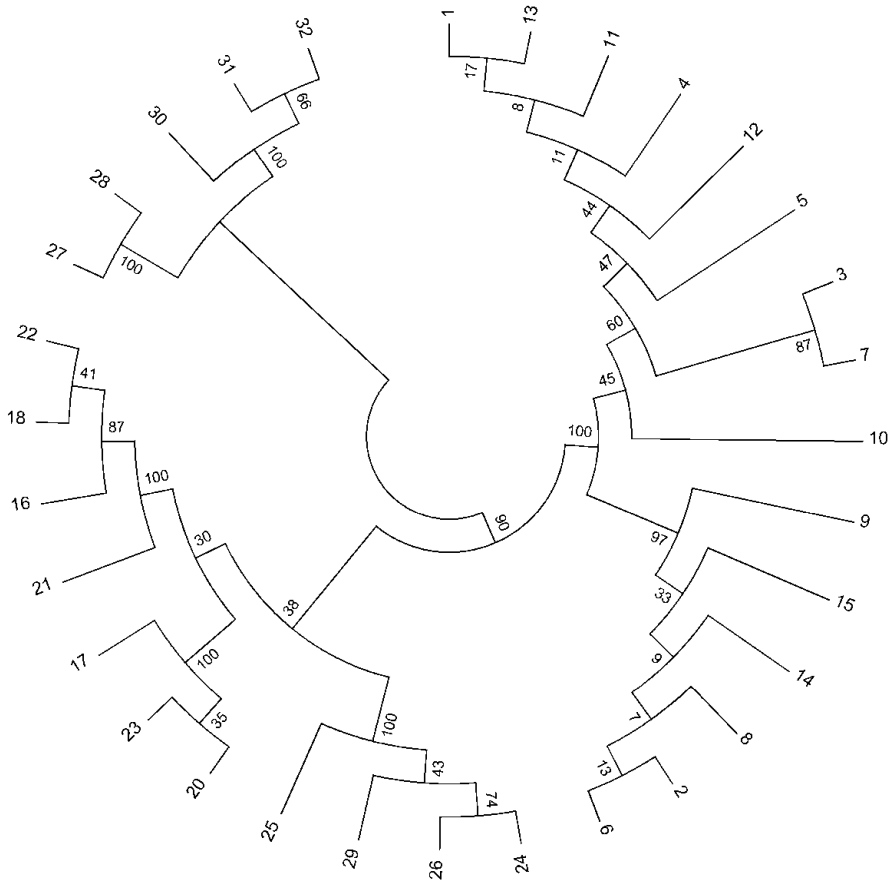
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. 16																
2. 17	0.162															
3. 18	0.000	0.162														
4. 20	0.162	0.000	0.162													
5. 21	0.003	0.167	0.003	0.167												
6. 22	0.002	0.164	0.002	0.164	0.005											
7. 23	0.162	0.000	0.162	0.000	0.167	0.164										
8. 24	0.181	0.186	0.181	0.186	0.176	0.183	0.186									
9. 25	0.178	0.184	0.178	0.184	0.173	0.180	0.184	0.002								
10. 26	0.183	0.189	0.183	0.189	0.178	0.186	0.189	0.002	0.003							
11. 27	0.251	0.309	0.251	0.309	0.257	0.254	0.309	0.294	0.294	0.297						
12. 28	0.250	0.317	0.250	0.317	0.250	0.253	0.317	0.286	0.286	0.290	0.003					
13. 29	0.178	0.184	0.178	0.184	0.173	0.180	0.184	0.002	0.000	0.003	0.294	0.286				
14. 30	0.288	0.302	0.288	0.302	0.281	0.285	0.302	0.245	0.241	0.248	0.274	0.271	0.241			
15. 31	0.288	0.302	0.288	0.302	0.282	0.285	0.302	0.251	0.248	0.254	0.275	0.272	0.248	0.003		
16. 32	0.295	0.309	0.295	0.309	0.288	0.292	0.309	0.251	0.248	0.254	0.281	0.278	0.248	0.003	0.003	

۱۰-٤- درخت فیلوژنتیک

ترسیم درخت فیلوژنتیک بر اساس توالی DNA به دست آمده برای هر نمونه و بر اساس دو روش تلفیق همسایه‌ها (Neighbor-Joining= NJ) به‌عنوان یک روش فاصله‌ای و روش حداکثر تکاملی (Maximum Evolution=ME) با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5.0 صورت گرفت. شکل‌های ۳-۷ و ۳-۸ به ترتیب تفاوت و تشابه ژنتیکی میان گونه‌های مورد بررسی را با دو روش NJ و ME نشان می‌دهد.



تصویر ۱- درخت فیلوژنتیک برای توالی DNA ژن COI گونه‌های مورد مطالعه بر اساس neighbur joining و توسط نرم‌افزار Mega 5.0



تصویر ۲-درخت فیلوژنتیک برای توالی DNA ژن COI گونه‌های مورد مطالعه بر اساس Maximum Evolution و توسط نرم‌افزار Mega 5.0

۵-بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش نمونه ها مورد بررسی آنالیز آماری و فیلوژنتیک و همچنین بررسی بیوانفورماتیک در تقابل با پایگاه داده‌های CBOL قرار گرفتند.

در روش اول توالی‌های بارکد DNA با دو روش تلفیق همسایه‌ها (Neighbor-Joining= NJ) به‌عنوان یک روش فاصله‌ای و روش حداکثر تکاملی (Maximum Evolution=ME) با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5.0 مورد تجزیه تحلیل فیلوژنتیکی قرار گرفتند. نتایج نشان داد، در هر دو روش NJ و ME ۳ کلاد و یک گروه مجزا برای این ۱۶ نمونه با تخمین و برآورد فاصله ژنتیکی برای دوبه‌دوی نمونه‌ها صورت گرفت. در درخت فیلوژنتیکی حاصل از روش NJ (شکل ۳-۷) نمونه‌های ۱۸، ۲۲، ۱۶، ۲۱، ۱۷، ۲۰ و ۲۳ در کلاد یک، نمونه‌های ۲۵، ۲۹، ۲۴ و ۲۶ در کلاد ۲، نمونه‌های ۲۷، ۲۸ در گروه ژنتیکی جداگانه و نمونه‌های ۳۰، ۳۱ و ۳۲ در کلاد ۳ قرار گرفتند.

لازم به ذکر است که در روش NJ بر اساس فاصله ژنتیکی نمونه‌ها و با یافتن پی‌درپی جفت‌های نزدیک به هم درخت رسم می‌گردد و جفت OTU ها یا گره‌ی داخلی به هم وصل نمی‌شوند. همچنین روش خوشه‌بندی به‌کاررفته توسط این الگوریتم، تلاش نمی‌کند تا شبیه‌ترین OTU ها را خوشه‌بندی کند و به‌جای آن طول همه‌ی شاخه‌های داخلی و سپس طول کل درخت را به حداقل می‌رساند. درواقع الگوریتم NJ با فرض یک درخت بوته مانند (Star شکل) آغاز می‌شود که هیچ نشانه داخلی ندارد. در قدم اول اولین شاخه‌ی داخلی وارد می‌شود و طول درخت حاصل محاسبه می‌شود و الگوریتم پی‌درپی هر جفت ممکن از OTU ها را متصل می‌کند و سرانجام جفت OTU هایی که منجر به کوتاه‌ترین درخت شود را به هم وصل می‌کند. ازاین‌رو برآورد و محاسبه فاصله ژنتیکی دوبه‌دوی نمونه‌های ضروری است که نتایج آن در جدول ۱۸ آورده شده است.

در درخت فیلوژنتیک ترسیم شده با روش ME نیز تفکیک و تقسیم‌بندی مذکور به دست آمد (شکل ۳-۸) که بیانگر صحت کار در روش اول نیز است.

در روش دوم که در تطابق با پایگاه داده‌های توالی گونه‌های شناخته شده در CBOL است و در جدول ۱۷ تجمیع گردیده است بر اساس میزان شباهت نوکلئوتیدی با نزدیک‌ترین گونه‌های ثبت شده در CBOL ۱۶ نمونه مورد بررسی به دو گروه تقسیم می‌گردند.

گروه اول نمونه‌های شماره ۱۶، ۱۸، ۲۱، ۲۲، ۲۴، ۲۵، ۲۶ و ۲۹ می‌باشند که تشابه نوکلئوتیدی آن‌ها با گونه‌های شناخته شده بیش از ۹۵ درصد است و در صورت احراز بقیه موارد شناسنامه زیستی و ژنتیکی و مورفولوژیک می‌توانند جزء همان جنس و گونه مذکور طبقه‌بندی گردند.

گروه دوم نمونه‌های شماره ۱۷، ۲۰، ۲۳، ۲۷، ۲۸، ۳۰، ۳۱ و ۳۲ می‌باشند که تشابه ژنتیکی آن‌ها با جنس و گونه‌های شناخته شده کمتر از ۹۵ درصد است و می‌توانند به‌عنوان جنس و گونه جدید در پایگاه داده‌های بارکدینگ به نام ایران ثبت گردند. این تشابه کمتر مخصوصاً در مورد نمونه‌های ۱۷، ۲۰ و ۲۳ بسیار بارز و زیاد است که مستلزم بررسی و مطالعات بیشتر در جهت امکان معرفی جنس و گونه‌ها جدیدی است.

در این پروژه تحقیقاتی به‌طور خلاصه روشن گردید که تکنیک بارکدینگ DNA در مفاهیم و تحقیقات تاکسونومیک، ژنتیک جمعیت و فیلوژنتیک کاربرد دارد. در تاکسونومی بارکدینگ DNA برای تعیین هویت معمول نمونه‌ها و همچنین نشانه‌گذاری نمونه‌های غیرمعمول در تحقیقات جامع تاکسونومیک می‌تواند کاربرد داشته باشد. در مطالعات فیلوژنتیک، بارکدینگ DNA می‌تواند نقطه آغازی برای انتخاب بهینه تاکسای مناسب باشد و توالی بارکد به داده‌های توالی برای آنالیز فیلوژنتیک افزوده گردد. در مباحث ژنتیک جمعیت، بارکدهای DNA می‌توانند اولین علامت از گستردگی و طبیعت تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت باشند که مطالعات مقایسه‌ای تفاوت‌های جمیعت را در بسیاری از گونه‌ها ساده‌تر می‌سازد.

همچنین روش بارکدینگ DNA به‌عنوان روشی مؤثر، ساده و ارزان برای تعیین هویت مولکولی گونه‌های شناخته شده و شناسایی گونه‌های جدید میگو که نیاز به مطالعات بیشتر دارد معرفی گردید. بر اساس این روش تغییرات، تعداد و توالی ۶۵۰ نوکلئوتید ژن استاندارد سیتوکروم اکسیداز ۱، می‌تواند بیانگر تغییرات منحصر به فرد برای هرگونه باشد. ژن کد کننده پروتئین COI عموماً نسبت به سایر ژن‌های ریبوزومی میتوکندری نه‌تنها تفاوت بیشتری را در سطح گونه نشان می‌دهد، بلکه در تشخیص گونه‌های بسیار نزدیک مناسب‌تر است.

منابع

- رهنما رؤیا، حسینی سید جواد, قاسمی سید احمد, یاوری وحید, ذوالقرنین حسین و متین فر عباس. مقایسه مولکولی اولیه *P. (penaeus) semisulcatus* خلیج‌فارس و زیرگونه آن *P. (penaeus) semisulcatus persicus* با استفاده از 16S rRNA میتوکندریایی.
- رضائی, س., سیوان, فرحمند, نعمت الهی. (۲۰۱۴). بررسی تنوع ژنتیکی در میگوی *Litopenaeus vannamei* با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی SSR در بندر جاسک استان هرمزگان. شیلات, ۶۷(۱), ۶۱-۷۴.
- Bilgin, R., Utkan, M. A., Kalkan, E., Karhan, S. U., & BEKBÖLET, M. (2014). DNA barcoding of twelve shrimp species (Crustacea: Decapoda) from Turkish seas reveals cryptic diversity. *Mediterranean Marine Science*, *16*(1), 36-45.
- Hajibabaei, M., Singer, G. A., Hebert, P. D., & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. TRENDS in Genetics, 23(4), 167-172.
- Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; DeWaard, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2003**, *270*, 313-321.
- Jahn, R., Zetzsche, H., Reinhardt, R. and Gemeinholzer, B. (2007) Diatoms and DNA barcoding: A pilot study on an environmental sample. *Proceedings of the 1st Central European Diatom Meeting.* 63-68.
- Klinbunga S, Penman DJ, McAndrew BJ, Tassanakajon A (1999) Mitochondrial DNA diversity in three populations of the giant tiger shrimp Penaeus monodon. Mar Biotechnol 1:113–121
- Klinbunga S, Siludjai D, Wuthijinda W, Tassanakajon A, Jarayabhand P, Menasveta P (2001) Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (Penaeus monodon) in Thailand revealed by RAPD and mtDNA-RFLP analyses. Mar Biotechnol 3:428–438
- Klinbunga S, Sodsuk S, Penman DJ, McAndrew BJ (1996) An improved protocol for total DNA isolationand visualisation of mtDNA-RFLP(s) in tiger prawn, Penaeus monodon. Thai J Aquat Sci 3:36–41
- Kumar N, Lakra WS, Majumdar KC, Goswami M, Ravinder K (2007) Genetic diversity in the Indian population of Penaeus monodon (Fabricius, 1798) as revealed by mtDNA sequence analysis. Aquac
- Lavery S, Chan TY, Tam YK, Chu KH (2004) Phylogenetic relationships and evolutionary history of theshrimp genus Penaeus s.l. derived from mitochondrial DNA. Mol Phylogenet Evol 31:39–49.
- Lee, s., Oak, J. H., Chung, I. K. and Lee, J. A. (2010) Effective molecular examination of eukaryotic plankton speciesdiversity in environmental seawater using environmental PCR, PCR-RFLP, and sequencing. *Journal* of *Applied Phycology*.
- Limsuwan C (2004) Diseases of Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) cultured in Thailand. In Proceeding of the JSPS-NRCT international symposium joint seminar 2004: management of food safety in aquaculture and HACCP. Kasetsart University, Bangkok, pp 36–41
- Liu ZF, Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics.Aquaculture 238:1–37
- Moro, C. V., Crouzet, O., Rasconi, S., Thouvenot, A., Coffe, G., Batisson, I. and 63. Jacques, B. (2009) New Design Strategy for Development of Specific Primer Sets for PCR-Based Detection of *Chlorophyceae* and *Bacillariophyceae* in Environmental Samples. *Applied And Environmental Microbiology.* 75(17): 5729–5733.
- Newell, G. E. and Newell, R. C. (1977) Marine Plankton. HarperCollins Publishers Ltd. 240 pp.
- Not, F., del Campo, J., Balagué, V., de Vargas, C. and Massana, R. (2009) New insights into the diversity of marine picoeukaryotes. *PLoS ONE*. 4: e7143.
- Rajkumar, G., Bhavan, P. S., Udayasuriyan, R., & Vadivalagan, C. (2015). Molecular identification of shrimp species, Penaeus semisulcatus, Metapenaeus dobsoni, Metapenaeus brevicornis, Fenneropenaeus indicus, Parapenaeopsis stylifera and Solenocera crassicornis inhabiting in the coromandel coast (Tamil Nadu, India) using MT-COI gene.
- Rajkumar, G., Bhavan, P. S., Udayasuriyan, R., & Vadivalagan, C. (2015). Molecular identification of shrimp species, Penaeus semisulcatus, Metapenaeus dobsoni, Metapenaeus brevicornis, Fenneropenaeus indicus, Parapenaeopsis stylifera and Solenocera crassicornis inhabiting in the coromandel coast (Tamil Nadu, India) using MT-COI gene.
- Rehnstam-Holm, A. & Godhe, A. (2000) Genetic engineering of algal species. *Genetic Engineering of Algal Species*. 3

- Res 38:862–869
- Savin, M. C.,. Martin, J. L., Legresley, M., Giewat, M. and Rooney-Varga, J. (2004) Plankton diversity in the Bay of Fundy as measured by morphological and molecular methods. *Microbial Ecology*. 48: 51–65.
- -Shokralla, S.; Singer, G.A.C.; Hajibabaei, M. Direct PCR amplification and sequencing of specimens' DNA from preservative ethanol. *BioTechniques* **2010**, *48*, 305-306.
- Sournia, A., Chrétiennot-Dinet, M. J., Ricard, M. 1991. Marine phytoplankton: how many species in the world ocean?.*Journal of Plankton Research.*13: 1093–1099.
- Stoeckle, M. (2003) Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *BioScience*.53: 2-10.
- Supungul P, Sootanan P, Klinbunga S, Kamonrat W, Jarayabhand P, Tassanakajon A (2000) Microsatellite polymorphism and the population structure of the black tiger shrimp (Penaeus monodon) in Thailand. Mar Biotechnol 2:339–347
- Tamura, k., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596-1599
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. (2005). DNA
- barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society B:
- Biological Sciences, 360(1462), 1847-1857.
- Webb, K. E., Barnes, D. K. A., Clark, M. S. & Bowden, D. A. (2006) DNA barcoding: A molecular tool to identify Antarctic marine larvae. *Deep-Sea Research*. 53: 1053-1060.
- Will, K. W., and D. Rubinoff. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. Cladistics 20:47–55.
- Will, K.W.; Mishler, B.D.; Wheeler, Q.D. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Syst. Biol.* **2005**, *54*, 844-851.

Abstract:
DNA barcode is a short, standard well known sequence of cytochrome oxidase I gene. By using this DNA sequence can be realized that each animal, plant or fungus belongs to which species. in this research, samples were collected from imported cultured shrimp Litopenaeus vannamei and and 6 Persian Gulf and Oman Sea shrimp species which classified based on traditional systematically as: Penaeus semisulcatus, Fenneropenaeus merguiensis, Metapenaeus affinis, Parapenaeopsis Stylifera and Fenneropenaeus indicus. After examination of DNA barcode sequence, molecular and bioinformatics operations of each sequence in the Consortium for the Barcode of Life (CBOL) and National Center for Biotechnology Information (NCBI), phylogenetic analysis of each sample was determined and similarity of each sample with NCBI and CBOL database was checked and the closest species to each sample were specified. According to the results different samples of L. vannamei, . banded P.semisulcatus, F. merguiensis and F. indicus have more than 97% similarity to the same species of other countries. non banded P.semisulcatus had 80.07% similarity to banded P.semisulcatus, M. affinis samples had 90.3% similarity to Metapenaeus ensis and Parap. Stylifera had 93.44% similarity to Parapenaeopsis coromandelica in the CBOL. This funding confirmed the need for further investigation and possible announcement of new species

Keywords: DNA barcode, Shrimp, *Litopenaeus vannamei*، *Penaeus semisulcatus*،*Fenneropenaeus merguiensis*، *Metapenaeus affinis*، *Parapenaeopsis Stylifera* ،*Fenneropenaeus indicus*

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

---

Project Title : Development gene data bank of cultured shrimp species in Iran
Approved Number: 14-80-12-9106- 91003- 9101K
Author: Vahid Yeganeh
Project Researcher : Vahid Yeganeh
Collaborator(s) *:* M. Afshrnasab, M. Mirbakhsh, B. Ghaednia, A. Dashtian nasab, E. Keshtkar, M.A. Nazari, M. Hossini, F. Ansari, Gh. gharibi, S. Rezvani, E. Mohmmadi, Sh. Jamili, M.J. Shabani, K. Khorshidian, M.Kh. Pazir, , S. Tamadoni
Advisor(s): J. Hossini, L. Parsa yeganeh
Supervisor: -
Location of execution : Bushehr province
Date of Beginning : 2013
Period of execution : 2 Years & 4 Months
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2017

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 :

Development gene data bank of cultured shrimp species in Iran

Project Researcher :

Vahid Yeganeh

Register NO.

50726