وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان :

ایجاد بانک ژن میگوهای بومی و سخت پوستان خلیج فارس و دریای عمان

مجری مسئول :
سعید تمدنی جهرمی

شماره ثبت
۴۹۷۲۳

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان پروژه ملی : ایجاد بانک ژن میگوهای بومی و سخت پوستان خلیج فارس و دریای عمان
شماره مصوب پروژه : ۹۱۰۰۱-۸۹۱۹-۱۲-۷۵-۰۱۴
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : سعید تمدنی جهرمی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : سعید تمدنی جهرمی
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : سعید تمدنی جهرمی
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان (مراکز):آرمین عابدیان (استان سیستان و بلوچستان)- عقیل دشتیان نسب(استان بوشهر)- جاسم غفله مرمضی (استان خوزستان)
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : احمد غرقی ، سهراب رضوانی گیل‌کلایی، محمدرضا صادقی، تورج ولی‌نسب، مرضیه بصیرت ، ستاره صمدی، الهام مقصودلو، مالک محمدیها
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : محمد پورکاظمی
محل اجرا : استان هرمزگان
تاریخ شروع : ۹۱/۱/۱
مدت اجرا : ۳ سال و ۹ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۵
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : ایجاد بانک ژن میگوهای بومی و سخت پوستان خلیج فارس و دریای عمان

کد مصوب : ۰۱٤-۷۵-۱۲-۸۹۱۹-۹۱۰۰۱

شماره ثبت (فروست) : ٤۹۷۲۳ تاریخ : ۹۵/٤/۸

با مسئولیت اجرایی جناب آقای سعید تمدنی جهرمی دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته بیوتکنولوژی می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فنآوری و فرآوری آبزیان در تاریخ ۹۴/۱۲/۲۲ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۱-۱- تنوع زیستی ۲
۱-۲- بانک ژن(gene bank) چیست؟ ۴
۱-۳- وظایف بانک ژن ۵
۱-۴- تنوع زیستی چگونه تهدید می شود ۶
۱-۵- رده بندی گونه های مورد مطالعه ۱۰
۱-۵-۱- گونه های مورد مطالعه در تهیه بانک ژن ۱۰
۱-۵-۲- رده بندی جانوری خانواده Penaeidae ۱۰
۱-۲-۵-۱- میگوی سفید هندی(*Fenneropenaeus indicus*) ۱۰
۱-۲-۵-۲- میگوی موزی *Fenneropenaeus merguiensis* ۱۳
۱-۲-۵-۳- میگوی سر تیز ۱۵
۱-۲-۵-۴- پنائئوس سمی سولکاتوس.*Penaeus semisulcatus (De Hoan, 1844)* ۱۷
۱-۲-۵-۵- پنائئوس مونودون : *Penaeus monodon* ۱۹
۱-۶- نقش مهاجرت در ایجاد اختلاف ژنتیکی گونه های میگوی خانواده پنائیده ۲۰
۱-۷- تکنیکهای مولکولی و کاربرد آنها جهت بررسی جمعیتها و تکثیر و پرورش آبزیان ۲۵
۱-۸- بانک ژن ۳۴
۲- مروری بر منابع ۳۵
۲-۱- مطالعات و تحقیق در ایران ۳۵
۲-۲- مطالعه و تحقیق در خارج از کشور ۳۹
۳- مواد و روشها ۴۲
۳-۱- موارد مورد استفاده ۴۲
۳-۲- دستگاههای مورد استفاده ۴۳
۳-۳- روشها ۴۳
۴- نتایج ۵۲
۴-۱- ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۵۲

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

۲-۴- تکثیر و مقایسه توالی‌های 16SrRNA ۵۳
۱-۲-۴- تکثیر ژن 16SrRNA ۵۳
۲-۲-۴- نتایج حاصل از تعیین توالی ژن 16SrRNA ۵۳
۳-۲-۴- هم ردیفی توالی‌های بازسازی شده با استفاده ازClustal W ۵۳
۴-۲-۴- ترسیم درخت تکاملی ۵۶
۳- ۴- تکثیر و مقایسه توالی‌های ژن COI ۶۱
۱-۳-۴- تکثیر ژن 16SrRNA ۶۱
۲-۳-۴- نتایج حاصل از تعیین توالی ژن COI ۶۱
۳-۳-۴- هم ردیفی توالی‌های بازسازی شده با استفاده از Clustal W ۶۱
۴-۳-۴- ترسیم درخت تکاملی ۶۴
۵- بحث و نتیجه گیری ۶۹
پیشنهادها ۷۳
منابع ۷۴
چکیده انگلیسی ۷۹

چکیده

مطالعات ژنتیک و ایجاد بانک ژن می‌تواند رهنمودهایی برای بهبود تنوع و شناسایی ساختار جمعیت ، صید قاچاق، تشخیص میزان هم خونی و طبقه بندی ژنتیکی جانوران ارائه نماید . در این تحقیق نمونه برداری از مناطق جاسک ، گواتر و هرمز که مهمترین زیستگاه های گونه های مورد مطالعه می‌باشد به روش ترال کف انجام گرفت. استخراج Total DNA با استفاده از فنل – کلروفورم انجام گردید. پس از توالی‌یابی با استفاده از نرم افزار BioEdit و ابزار قدرتمند Blast و رویه Blasten در پایگاه NCBI میزان همولوژی توالی‌های بدست آمده سنجیده شد و و رسم درخت فایلوژنی و میزان فاصله ژنتیکی گونه های مورد نظرانجام گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به طول موج ۲۸۰ نانومتر در نمونه ها بین ۱/۸– ۲/۱ قرار داشت که نشانگر کیفیت خوب DNA نمونه ها بود. بهینه سازی واکنش PCR جهت تکثیر ژن 16SrRNA و COI با استفاده از گرادیانت دمایی ۶۰- ۴۸ درجه سانتیگراد نشان داد که مناسب‌ترین دما برای اتصال آغازگر، دما های ۴۸ و ۵۴ درجه سانتیگراد برای گونه های مختلف مورد مطالعه میباشد.

این طرح با اهدافی از جمله شناسائی ساختار ژنتیکی گونه ها، و رسم درخت فایلوژنی آنها با استفاده از دو ژن 16s و COI ، تهیه شناسنامه و ثبت کامپیوتری مشخصات سلولهای ذخیره شده و ساماندهی ساختار و تمرکز مدیریت بر منابع ژنتیکی ۵گونه مهم از میگوهای منطقه خلیج فارس(*P. semisulcatus* ، *P. indicus* ، *P. merguiensis* ، *P. monodon* ، *M. affinis*) از طریق ایجاد یک شبکه منسجم ذخایر ژنتیکی آبزیان این منطقه سعی در شناسایی ذخایر ژنتیکی و ایجاد بانک ژن آبزیان با اهداف ذکر شده دارد.

نتایج این مطالعه نشان می دهد که دو مورفوتایپ میگوی ببری سبز می تواند به عنوان دو گونه جدا از جنبه های ژنتیکی در نظر گرفته شود که در مطالعات ژنتیک جمعیت و مولد سازی میبایست مورد توجه قرار گیرد. در همین رابطه میتوان استنتاج کرد که ترکیب ژنی گونه های مورد بررسی بسیار نزدیک به هم میباشد و ما بجر اختلاف زیادی که در گونه ببری سبز مشاهده کردیم در گونه های دیگر مشاهده نشدو هیچ سابقه قبلی از انتقال مولدین بین مناطق مختلف وجود ندارد.

واژه های کلیدی: بانک ژن میگو ، mtDNA ، ذخایر ژنتیکی،16s rRNA ، سیتوکرم اکسیداز، میگوی موزی ، میگوی سفید هندی ، میگوی ببری سبز ، میگوی ببری سیاه ، میگوی سرتیز

۱-مقدمه

۱-۱- تنوع زیستی

بخش حساسی از سرمایه های طبیعی است که خوراک، پوشاک و مسکن و بسیاری از داشته های ما از این سرمایه تامین می شود و روند آن با سرازیر شدن میلیاردها دلار سود به بازارهای اقتصادی جهان، همچنان ادامه دارد. تنوع زیستی علاوه بر آن که توسعه کشاورزی را ممکن می سازد، امکان سازگاری با شرایط جدید را برای گونه هایی که فاقد چنین امکاناتی هستند، فراهم می آورد. تنوع زیستی علاوه بر آنکه نیازهای ضروری و اولیه انسان ها را نظیر خوراک، پوشاک و مسکن فراهم می آورد، سلامت و شادابی روح و جسم، رونق اقتصادی و پیشرفت روزافزون و همه جانبه ما را نیز تضمین می کند.در حقیقت تنوع زیستی نوعی بیمه طبیعت در برابر حوادث بد و ناگوار است . بر اساس تعریف دبیرخانه کنوانسیون تنوع زیستی، تنوع زیستی به معنای قابلیت تمایز بین ارگانیسم های زنده از هر منبع شامل اکوسیستم های زمینی، دریایی و اکوسیستم های آبزی، همچنین شامل ترکیبات اکولوژی که بخشی از اکوسیستم ها را تشکیل می دهند، می باشد.در نهایت و در یک جمله تنوع زیستی در واقع گوناگونی حیات و حکمت مجسم خالق بی همتاست.این تنوع از سه مفهوم مرتبط به هم تشکیل شده است: تنوع ژن ، تنوع گونه و تنوع زیست بوم (اکوسیستم).

روند ترکیب و تکامل گونه های جدید و نیز انقراض گونه هایی که توان سازگاری با تغییرات شرایط محیطی را نداشتند، بیش از چند میلیارد سال به طول انجامید تا سرانجام موسوم به کره زمین به وجود آمد که ارزشمندترین منبع آن تنوع زیستی است . تنوع زیستی شبکه ای از همه موجودات زنده، اعم از گیاهی و جانوری است و نژادهای انسانی، جانوران، گیاهان، قارچ ها و سایر جانداران تک سلولی را در بر می گیرد. تنوعی که ما امروزه می بینیم شبکه حیاتی است که میوه بیلیون ها سال تکامل می باشد و ما جزئی لاینفک از آن هستیم و کاملا به آن وابسته ایم . در حقیقت تنوع زیستی به تنوع حیات بر روی زمین و الگوهای طبیعی آن بر می گردد.

هم اکنون انقراض گونه های موجود ۵۰ تا ۵۰۰ برابر بیشتر از ۶۵ میلیون سال قبل است و برآورد می شود که حدود ۱ میلیون گونه تا سال ۲۰۵۰ در معرض خطر انقراض قرار دارند . البته دلیل بسیاری از این مسائل به درستی شناخته نشده اند.

وضعیت پر تلاطم و بحرانی زیستگاه هاعمدتاً حاصل دخالتهای مخرب انسانی که هم اینک گریبانگیر محدوده آبهای خلیج فارس و دریای عمان شده است و تغییرات شدید آب و هوایی سالیان اخیر و همچنین آلودگی های نفتی پیامد جنگ در خلیج فارس و عبور و مرور کشتی های نفتکش که مقادیر بسیار زیادی نفت را به عنوان آب توازن به درون خلیج فارس میریزند و همچنین وجود نیروگا های برق و آب شیرین کن ها و پساب مزارع پرورش میگو و سایر ابزیان سرعت افول و انقراض ارگانیسمهای زنده را بسیاربالا برده به گونه ای که هر روز تعداد فراوانی از موجودات از میکرو ارگانیسمها گرفته تاجانوران و گیاهان پر سلولی در این منطقه مورد تهدید قرار گرفته و گونه ای

مهم را در خطر انقراض قرار داده است. لذا ایجاد بانکهای بزرگ بافت و DNA ژنومی از موجودات زنده دربسیاری از کشورهای جهان از جمله منطقه خلیج فارس و دریای عمان درراستای نگه داری نسخه هایی از ژنوم ذخایر ارزشمند ژنتیکی مهم میباشد . متاسفانه در وضعیت موجود ساماندهی ساختار و تمرکز مدیریت بر منابع ژنتیکی آبزیان حوزه خلیج فارس و دریای عمان از طریق ایجاد یک شبکه منسجم ذخایر ژنتیکی آبزیان این منطقه وجود ندارد و شناسنامه ای از ذخایر ژنتیکی و گونه های در معزض خطر گیاهی و جانوری در این منطقه ایجاد نشده است . این امر مهم و اساسی است که ذخایر به عنوان واحد های مدیریتی اساسی می باشد که در پارامترهای رشد و مرگ ومیر اشتراک دارند و خفاظت و صیانت قانونی از حقوق ملی بر منابع ژنتیکی آبزیان خلیج فارس و دریای عمان امری اجتناب ناپذیر است.

تحقیقات در زمینه ژنتیک و زیست فناوری در آبزیان رشد پیوسته خود را از اواسط دهه ۱۹۸۰ آغاز کرده است و در حال حاضر تحقیقات در این زمینه بسیار فعال است. از جمله مهمترین زمینه‌های فعالیت تحقیقات ژنتیک آبزیان میتوان به استفاده از اصول ژنتیک و زیست فناوری به وسیله مدیران شیلاتی و محققان جهت افزایش میزان صید طبیعی، مدیریت صحیح ذخایر آبزیان، مدیریت تکثیر و پرورش در قفس و یا محیط مصنوعی، بازسازی جمعیتهای بومی و حفاظت از ذخیره ژنی و تنوع ژنتیکی در منابع طبیعی و گونه های در معرض انقراض اشاره نمود (Dunham2004).

نگهداری مطلوب از ذخایر ژنتیکی جانوری و گیاهی و حفظ تنوع زیستی به عنوان سرمایه‌های ملی با استفاده از تکنیک‌های زیست فناوری از مهمترین اهداف ایجاد بانک ژن است.جمع آوری نمونه های بیولوژیک گونه های مختلف، آماده سازی و نگهداری بلند مدت آن، ثبت ژنتیکی گونه های در معرض تهدید و در حال انقراض و استفاده از تکنیک های زیست فناوری برای حفظ، بقا و مدیریت گونه های جانوری و گیاهی از جمله وظایف بانک ژن می باشد.می توان گفت جمع آوری نمونه ، پایه و اساس اطلاعات مولکولی برای هر نوع مطالعه سیستماتیک و ژنتیک جمعیت است.یکی از بهترین تکنیک ها پس از مطالعه، حفاظت از زیستگاه است به طوری که اگر زیستگاه حفظ شود از انقراض گونه‌های در معــرض خطر و بسیاری از گونه‌های دیگر نیز جلوگیری می‌گردد.مطالعات ژنتیک جمعیت برای حفظ و مدیریت جمعیت های جانوری و گیاهی و ساماندهی پژوهش ها و تحقیقات به منظور کاربردی شدن مطالعات در حفظ طبیعت و اکوسیستم ها نیز به وسیله بانک ژن انجام می شود. دستیابی به روشهای تکثیر در اسارت گونه های در معرض تهدید و در حال انقراض و ارزیابــی آلودگی های زیست محیطی و اثرات ناشی از آن در اکوسیستم ها و روند انقراض گونه ها، از مهمترین مزایای استفاده از بانک ژن درحفاظت از محیط زیست و اکوسیستم ها است.در بانک ژن امکان بررسی و تدوین قوانین و ضوابط مربوط به ورود و خروج غیرقانونی

نمونه های بیولوژیک نیز وجود دارد .امکان ساماندهی درخواست های ارائه شده برای تکثیر در اسارت گونه های وحشی که گاهی باعث فرسایش ژنتیکی و کم شدن تنوع زیستی می شوند، فراهم شده است.

هر نوع تداخل در این سیستم منجر به برهم خوردن این رابطه ظریف زیستی خواهد شد. نمونه بسیار بارزی که می توان در این زمینه برشمرد تداخل انسان در اکوسیستم های طبیعی است. انسان با تبدیل اکوسیستم های مرتعی و جنگلی به مزارع باعث برهم خوردن روابط زیستی موجود شده و اختلالات بسیاری را به وجود آورده است. در این مورد انسان با این عمل تنوع داخل اکوسیستم ها را کاهش داده توانایی های ذاتی آن را از بین می برد. کاهش تنوع باعث کاهش نقش اکوسیستم ها در جذب آلاینده های محیطی (مثل گازهای سمی)، کاهش حاصل خیزی خاک ،به هم خوردن روابط شکار و شکارچی بین موجودات حیوانی می شود. اثر متقابل بین کشاورزی و تنوع زیستی نیز مهم است . حدود هفتاد درصد اکوسیستم های زمین جهت کسب ۹۸٪ غذا ، پوشاک و چوب برای انسان دستکاری شده است . علاوه بر آن حدود ۲۵٪ سطح زمین به شهرسازی و سکونت انسان اختصاص دارد و بدین ترتیب انسان حدود ۹۵٪ اکوسیستم های خشکی را به تصرف خود درآورده است.

در ادوار گذشته انسان با نزدیکی با طبیعت سعی می کرد حداقل مداخله را در اکوسیستم ها به وجود آورد. و در حقیقت به عنوان جز زنده ای عمل می کرد. با شروع کشاورزی عملا مداخله انسان در طبیعت شروع شد. اهلی کردن گیاهان و حیوانات مرحله شروع کاهش تنوع بود.

در مواقعی که کاهش جمعیت گونه ها اتفاق می افتد و جمعیت با خطر انقراض مواجه می شود استفاده از روش های نوین از قبیل زیست فناوری را با کشت سلول و بافت گونه ها و سپس انتقال آن به زیستگاه اصلی فراهم می آورد . بانک Ex situ امکان حفاظت خارج زیستگاهی ژن به عنوان یکی از زیر مجموعه های گروه زیست فناوری، وظیفه جمع آوری ، آماده سازی و نگهداری بلند مدت نمونه های بیولوژیک گونه های مختلف را بر عهده دارد که مواد اولیه برای مطالعات مولکولی از قبیل شناسایی و ثبت ژنتیکی، تهدیدات ژنتیکی، تشخیص نمونه های مشکوک قضایی، احیاء گونه های در معرض تهدید و ...را با صرفه جویی در زمان و هزینه ماموریت ها و کاهش آسیب به محیط زیست تامین می کند.

۲-۱ : بانک ژن(gene bank) چیست؟

به طور کلی می توان سه تعریف را برای بانک ژن مطرح کرد:

1- مکانی است که دانشمندان در آن اطلاعات مربوط به DNA گیاهان ،جانوران و حتی انسان را ذخیره سازی کرده، به طوری که می توانند ژن مورد نظر را در زمانی خاص مجددا وارد خزانه ژنی (gene pool) کنند.

۲- مرکزی که برای ex situ حفاظت (حفاظت در خارج از زیستگاه) مواردی چون بذر ، بافت ها و سلول های تولید مثلی گیاهان و جانوران تاسیس شده است.

۳- هر مکانی را که به عنوان یک ذخیره گاه طبیعی ،چون :باغ، مزرعه، یا یک بانک بذر، تانک های نگهداری آبزیان هدف که در آن برای نظارت، مدیریت و حفاظت از گوناگونی ژنتیکی تلاش شده است می توان به عنوان یک بانک ژن در نظر گرفت.

۳-۱ : وظایف بانک ژن

ضرورت، اهداف و وظایف بانک ژن

۱- نگهداری مطلوب از ذخایر ژنتیکی جانوری و گیاهی و حفظ تنوع زیستی به عنوان سرمایه‌های ملی با استفاده از تکنیک‌های زیست فناوری از مهم ترین اهداف ایجاد بانک ژن است.

۲- جمع آوری نمونه های بیولوژیک گونه های مختلف، آماده سازی و نگهداری بلند مدت آن، ثبت ژنتیکی گونه های در معرض تهدید و در حال انقراض و استفاده از تکنیک های زیست فناوری برای حفظ، بقا و مدیریت گونه های جانوری و گیاهی از جمله وظایف بانک ژن می باشد.می توان گفت جمع آوری نمونه ، پایه و اساس اطلاعات مولکولی برای هر نوع مطالعه سیستماتیک و ژنتیک جمعیت است.

۳- یکی از بهترین تکنیک ها پس از مطالعه، حفاظت از زیستگاه است به طوری که اگر زیستگاه حفظ شود از انقراض گونه‌های در معــرض خطر و بسیاری از گونه‌های دیگر نیز جلوگیری می‌گردد.

۴- مطالعات ژنتیک جمعیت برای حفظ و مدیریت صحرایی جمعیت های جانوری و گیاهی و ساماندهی پژوهش ها و تحقیقات به منظور کاربردی شدن مطالعات در حفظ طبیعت و اکوسیستم ها نیز به وسیله بانک ژن انجام می شود

۵- دستیابی به روش های تکثیر در اسارت گونه های در معرض تهدید و در حال انقراض و ارزیابــی آلودگی های زیست محیطی و اثرات ناشی از آن در اکوسیستم ها و روند انقراض گونه ها، از مهمترین مزایای استفاده از بانک ژن درحفاظت از محیط زیست و اکوسیستم ها است.

۶- در بانک ژن امکان بررسی و تدوین قوانین و ضوابط مربوط به ورود و خروج غیرقانونی نمونه های بیولوژیک نیز وجود دارد. امکان ساماندهی درخواست های ارائه شده برای تکثیــر در اسارت گونه های وحشی که گاهی باعث فرسایش ژنتیکی و کم شدن تنوع زیستی می شوند، فراهم شده است.

بانک ژن این امکان را به ما میدهد که با تهیه سلولهای نر و ماده به عنوان پتانسیل بالقوه ایجاد مجدد گونه های منقرض شده را داشته باشیم و با حفظ سلولهای مختلف بدن گونه ها در جهت بررسی و تعیین نقشه ژنتیکهای تکرار

شونده این گونه ها که مبین یک گونه از سایر گونه ها میباشد اقدام کنیم و سپس با ثبت کامل مشخصات فنوتیپی و ژنوتیپی و بیوگرافی آنها در صورت انقراض در جهت معرفی به نسلهای آینده گام برداریم.

از آنجا که لایه های حفاظتی از منابع زیستی, حفاظت از ساختارهای ژنتیکی گونه های مختلف در ایران با اولویت در مناطق چهارگانه سازمان حفاظت محیط زیست است,بانک ژن از سال ۱۳۸۴ طراحی شد که هنوز قابل گسترش است.

به رغم ثبت تعدادی تازه از گونه های گیاهی و جانوری در فهرست گونه های در خطر یا نابود شده,فعالیتهای جاری بیوتکنولوژی در بسیاری از نقاط جهان سبب توقف یا کاهش روند انقراض گونه های زیستی شده است.

اگر چه روش مطلوب حفاظت گیاهان نگهداری در رویشگاه طبیعی آنها میباشد,ولی بنابر دلایل متعدد از جمله تغیرات عوامل اقلیمی,استفاده بی رویه,چرای دام و همچنین وقوع حوادث طبیعی و مصنوعی,حفظ گیاه در رویشگاه اصلی را با مشکل مواجه میکند.

تاکسونومی مولکولی در پی جبران این کاستی‌ها تا حد ممکن است و آن را با دو رویکرد دنبال می‌کند: یک، تعریف تاکسون‌های جدید یا بازآرایی تاکسون‌های شناخته شده بر پایه‌ی اطلاعات مولکولی و دو، به‌کارگیری داده-های مولکولی برای نسبت دادن نمونه‌های جدید به گونه‌های تعریف شده است. نگرش غالب امروزی در حوزه‌ی حفاظت محیط زیست، حفظ تنوع زیستی است. این تنوع می‌تواند در سطوح گوناگونی همچون نژاد، جمعیت، گونه، اکوسیستم یا زیستگاه مدنظر باشد. شناسایی دقیق گونه‌های زیستی حاضر در مناطق جغرافیایی مختلف برای برنامه‌ریزی پروژه‌های حفظ یا بازسازی محیط‌های در خطر بسیار به کار می‌آید. کنترل سریع و آسان ورود و خروج گونه‌ها در مرز کشورها و نیز پایش بازار در خصوص حضور فراورده‌های به دست آمده از گونه‌های مورد حمایت قانون از دیگر کاربردهای خط‌شناسه‌ی DNA برای حفاظت از گونه‌های آسیب‌پذیر است (Ardura, et al. 2010, Eaton, et al. 2009)

۴-۱: تنوع زیستی چگونه تهدید می شود ؟

در این رابطه میتوان اذعان کرد که تنوع زیستی با تخریب زیستگاه های جانداران به دست انسان ، تخلیه زباله ها و پساب ها در رودخانه ها و دریاها ، استفاده بیش از حد از آفت کش ها ، بهره برداری بیش از حد از منابع زنده (نظیر درختان، آبزیان و...) ، قربانی شدن گونه های گیاهی و جانوری به پای توسعه شهری و صنعتی

با انجام توسعه بدون ملاحظات زیست محیطی و همچنین انتقال گونه های گیاهی و جانوری به نقاط دوردست همواره مورد تهدید قرار میگیرد.

ایجاد بانک ژن راهی است که ضمن حفظ گونه های ارزشمند و یا گونه های در معرض خطر با نگهداری دهها جفت از هر گونه بصورت زنده و نیز بصورت بافت منجمد و یا نگهداری DNA در فریزر منهای ۸۰ در جه سانتیگراد و بویژه با ایجاد کتابخانه ژنی مطالعه ژنهای متعدد مثل ژنهای اقتصادی چون ژنهای رشد ، مقاومت به بیماری ، مقاومت به نوسانات دمایی ، نگهداری مطلوب از ذخایر ژنتیکی آبزیان و حفظ تنوع زیستی آنان به عنوان سرمایه‌های ملی با استفاده از روش‌های زیست فناوری ازمهمترین اهداف ایجاد بانک ژن است .این امر میتواند در حفظ و باز سازی ذخایر این گونه ها در آینده و همچنین استفاده محققان از گونه های ذخیره شده موثر باشد.همچنین در این پژوهش و در راستای ایجاد بانک ژن آبزیان واجرای این طرح سعی در تهیه شناسنامه و تعیین اختلاف ژنتیکی میگوهای مهم و اقتصادی آبهای خلیج فارس دارد . جمع آوری نمونه‌های بیولوژیک گونه‌های مختلف آبزیان ،آماده‌سازی و نگهداری بلندمدت آن، ثبت ژنتیکی گونه‌های در معرض تهدید ودر حال انقراض واستفاده از تکنیک‌های زیست فناوری برای حفظ، بقا ومدیریت گونه‌های آبزی از جمله دیگر وظایف بانک ژن است .

با توجه به اهمیت موضوع حفاظت ذخایر خدادادی ملی و وظیفه ای که در این خصوص بر عهده داشت، مسئولان بیش از پیش به نقش بانک ژن واقف و همّ خود را در توسعه و تقویت آن به کار گرفتند. مطالعات انجام شده قبلی منجر به اولویت بندی گونه‌های در معرض خطر از طریق بررسی نمونه‌های بیولوژیکی اعم از بافت، خون، پوست، عضله و سلول‌های زایشی شده است و تشکیل و راه اندازی بانک ژن آبزیان از ضروریات حفظ ذخایر ژنتیکی، به عنوان سرمایه‌های ملی بشمار می رود. میتوان انتظار داشت که با نگهداری مطلوب از ذخایر ژنتیکی جانوری و گیاهی و حفظ تنوع زیستی به عنوان سرمایه‌های ملی با استفاده از تکنیک‌های زیست فناوری ، جمع آوری نمونه های بیولوژیک گونه های مختلف، آماده سازی و نگهداری بلند مدت آن، ثبت ژنتیکی گونه های در معرض تهدید و در حال انقراض و استفاده از تکنیک های زیست فناوری برای حفظ، بقا و مدیریت گونه های جانوری و گیاهی به حفظ گونه های مهم و در معرض تهدید کمک نماید. . تاسیس بانک ژن آبزیان از جمله بانک ژن میگوهای مهم و اقتصادی کشور، به منظور دسترسی جامعه علمی کشور به رده های سلولی و هیبریدوماهایی که کاربرد آنها در واکسیناسیون و تحقیقات بنیادی و یا کاربردی میتواند از اهداف این پژوهش باشد مراکز تحقیقاتی داخل و خارج از کشور نیز می توانند بافت یا سلول های شاخص و بارزش ژنتیکی خودا را به بانک ژن آبزیان جمهوری اسلامی ایران اهدا نمایند. پیش بینی میشود که در فاز بعدی این پروژه با تهیه رده های سلولی از گونه های مختلف آبزیان علاوه بر حفظ ذخایر ژنتیکی ، بتوان با فروش رده های سلولی به مراکز پژوهشی و دانشگاهی کشور نسبت به ارتقای ان بخش قدم های شایان برداشته شود. این پروژه که در قالب طرح بانک ژن آبزیان جمهوری اسلامی ایران با اهدافی از جمله شناسائی ساختار ژنتیکی گونه ها، تهیه شناسنامه و ثبت کامپیوتری مشخصات سلولهای ذخیره شده و ساماندهی ساختار و تمرکز مدیریت بر منابع ژنتیکی آبزیان حوزه خلیج فارس و دریای عمان از طریق ایجاد یک

شبکه منسجم ذخایر ژنتیکی آبزیان این منطقه با همکاری کشور های حوزه خلیج فارس و دریای عمان سعی در شناسایی ذخایر ژنتیکی و ایجاد بانک ژن آبزیان با اهداف ذکر شده دارد.

سه نگاه عمده در ارتباط با اینکه چرا تهیه بانک ژن و مدیریت ذخایر میگو های مهم و اقتصادی منطقه یک امر اجتناب ناپذیر است:

۱- از نگاه بیولوژیک:

مرگ و میر بالا و طول دوره کم زندگی احتیاج به یک چهار چوب و برنامه منظم برای برداشت میگو و بالا بردن هر چه بیشتر درآمد دارد. تغییرات سالانه در ذخایر و راحتی شکار آنها توسط شکارچیان میتواند در این امر مهم باشد.

۲- از نگاه اقتصادی:

کنترل بر اساس ارزیابی ذخایر راه را برای سرمایه گزاری بدون هیچ شک و تردید و نگرانی از تغییرات پیش بینی نشده هموار میسازد. تقاضای بالای بازار داخل و صادرات مناسب صنعت صید میگو را از لحاظ اقتصادی حمایت کرده و به طبع آن شرایط مناسبی را برای رفاه مردم مناطق حاشیه خلیج فارس و دریای عمان فراهم میسازد.

۳- از نگاه اجتماعی:

صید ماهیان اغلب در تابستان به جهت مهاجرت به مناطق سرد تر کم و یا متوقف میگردد. فصل صید در تابستان تا ۶ هفته ادامه پیدا میکند و میتواند وقت و هزینه ماهیگیران را به نحوی جبران نماید. از آن گذشته میگو یکی از مهمترین منابع پروتیینی و با ارزش بوده و به راحتی قابل تهیه میباشد.(Khorshidian, 2000) .

میگوها کسترش جهانی داشته ودر دریاها، آبهای شور و شیرین از نواحی استوایی تا مناطق قطبی یافت می شوند با وجود اینکه اکثر گونه های دریایی در آبهای کم عمق یا نسبتا نیمه عمیق زندگی می کنند، اما برخی از گونه ها در اعماق نزدیک به ۵۷۰۰ متر یافت می شوند . با این حال ، بیشتر گونه های تجارتی در فلات قاره ها و اعماق کمتر از ۱۰۰ متر زیست می کنند. بیشتر میگوها پلاژیک و برخی نیز کفزی بوده و در مناطق متنوعی از لحاظ اکولوژیک به سر می برند (Niamaimandi, 2006) .

میتوان انتظار داشت که با نگهداری مطلوب از ذخایر ژنتیکی جانوری و گیاهی و حفظ تنوع زیستی به عنوان سرمایه‌های ملی با استفاده از تکنیک‌های زیست فناوری ، جمع آوری نمونه های بیولوژیک گونه های مختلف، آماده سازی و نگهداری بلند مدت آن، ثبت ژنتیکی گونه های در معرض تهدید و در حال انقراض و استفاده از تکنیک های زیست فناوری برای حفظ، بقا و مدیریت گونه های جانوری و گیاهی به حفظ گونه های مهم و در معرض تهدید کمک نماید..

از طرف دیگر ساماندهی ساختار و تمرکز مدیریت بر منابع ژنتیکی آبزیان حوزه خلیج فارس و دریای عمان از طریق ایجاد یک شبکه منسجم ذخایر ژنتیکی آبزیان این منطقه با همکاری کشور های حوزه خلیج فارس و دریای عمان و حفاظت و صیانت قانونی از حقوق ملی بر منابع ژنتیکی آبزیان این منطقه و همچنین معرفی جمهوری اسلامی ایران به عنوان فوکال پوینت منطقه خلیج فارس به نقش کشورمان در پیش قدم بودن در این عرصه در بین دیگر کشورهای منطقه اشاره دارد و میتواند دستاورد مهمی در منطقه برای کشور باشد.

میگوهای جنس پنائوس(Penaeus) یکی از مهمترین و ذخایر آبزیان اقتصادی در دریای عمان و خلیج‌فارس می‌باشند که نقش مهمی در صنعت صید و صیادی در کشور ایفا کرده و در صنایع تکثیر و پرورش نیز نقش بسزایی را دارند. این گروه با ارزش و متنوع در آبهای استوایی و نیمه استوایی در سراسر جهان یافت می‌شوند. در حالیکه اطلاعات زیادی درباره فیزیولوژی این جنس با اهمیت اقتصادی وجود دارد، تحقیقات کمی در مورد نسبتهای خویشاوندی و جمعیتی در این گروه با ارزش انجام شده است (Baldwin, et al., 1998). از گونه های مهم اقتصادی جهت تکثیر و پرورش گونه میگوی سفید هندی میباشد (Niamaimandi, 2006). همچنین گونه مهم غالب و اقتصادی جهت صید در استان هرمزگان گونه موزی میباشد که هم اکنون جهت تکثیر و رهاسازی این گونه اقدامات وسیعی در حال انجام میباشد. گونه پرورشی در ایران گونه میگوی سفید هندی (*P. indicus*) میباشد اگرچه گونه میگوی ببری سبز (*P. semisulcatus*) نیز هم اکنون به عنوان گونه ای مناسب در ارتباط با پرورش مورد توجه میباشد. (Niamaimandi, 2006).

۵-۱: رده بندی گونه های مورد مطالعه

۱-۵-۱: رده بندی جانوری خانواده Penaeidae

شاخه:	Arthropoda	(بند پایان)
زیر شاخه:	Crustacca	(سخت پوستان)
رده:	Malacostraca	(سخت پوستان عالی)
زیر رده:	Eumalacostraca	(سخت پوستان عالی واقعی)
فوق راسته:	Eucardia	(خرجنگهای حقیقی)
راسته:	Decapoda	(ده پایان)
زیر راسته:	Natantia	(ده پایان شناگر)
فوق خانواده:	Penaeoidea	(پنائیده آ)
خانواده:	Penaeidae	(پنئیده)
جنس:	Penaeus	(پنئوس)
زیر جنس:	Fenneropenaeus	(فنرو پنئوس)

۲-۵-۱ - گونه های مورد مطالعه در تهیه بانک ژن

۱-۲-۵-۱ : میگوی سفید هندی(*Fenneropenaeus indicus*)

شکل۱: میگوی سفید هندی

(SFC International Ltd)

میگوی سفید هندی دارای اسامی مختلفی است. در انگلیسی به نام Indian white shrimp که معادل نام فوق است معروف می باشد. در زبان فرانسوی به نام Crevetle Royale blanche خوانده می شود. کشورهای هند، اندونزی و ویتنام از تولیدکنندگان عمده این گونه میگو هستند.

خصوصیات کلیدی:

روستروم سیلندری شکل و دراز بوده و دارای ۹-۷ دندانه در قسمت پشتی و ۶-۴ دندانه در لبه پائینی می‌باشد. بدنی صورتی رنگ مایل به زرد و نیمه شفاف با لکه‌های سبز زیتونی تا خاکستری مایل به آبی دارد. پرئوپودها عموماً همرنگ بدن بوده و پلئوپودها صورتی یا قرمز رنگ می‌باشند.

در مرحله juvenile رنگ بدن مایل به سفید بوده و لکه های رنگی مشابه دوران بلوغ در آنها دیده می‌شود و پلئوپودها در این مرحله مایل به سفید می‌باشند (Holithuis 1980).

پراکنش زیستی:

الف- پراکنش در جهان

پراکنش میگوی جنس پنئوس در جهان در آبهای مناطق گرمسیری در عرض جغرافیایی ۴۰ درجه شمالی و ۴۰ درجه جنوبی می باشد که پراکنش گونه سفید هندی بیشتر شمال شرقی استرالیا ، اقیانوس هند ، هنک کنگ، فلیپین، دریای عمان و خلیج فارس، سواحل غربی دریای چین جنوبی، خلیج سیام (تایلند) ، مجمع جزایر مالزی، سواحل جنوبی عربستان سعودی، دریای سرخ، سواحل غربی تا سواحل ماداگاسکار. پراکنش آن در خلیج فارس و دریای عمان به میزان کمتری می باشد(دندانی، ۱۳۷۵).

ب- پراکنش در ایران

این میگو در ایران از منطقه جزیره هرمز تا پاکستان گسترده است (لازم به ذکر است که در محدوده جزیره هرمز تا بندر کلاهی از تراکم بسیار کمی برخوردار است). بر اساس مطالعات انجام شده بیشترین تراکم آن در محدوده شهرستان جاسک، جاسک کهنه ، مزاری ، شرق جاسک (جگین تا گابریک) بوده و صید میگوی مولد جهت مراکز تکثیر کشور در این منطقه صورت می گیرد .این میگو مهاجر بوده و بسترهای لجنی و نرم را ترجیح مدهد و از لحاظ رفتاری از سواحل تا عمق ۹۰ متری می تواند زندگی کند که بیشترین فراوانی آن در آبهای ساحلی کمتر از ۳۰ متر می باشد (کامرانی ۱۳۷۵ . زرشناس، ۱۳۷۷).

مورفولوژی

میگوی سفید هندی از نظر شکل ظاهری بدن ،به رنگ زرد کمرنگ مایل به سفید براق و خالهای آبی رنگ پراکنده با پاهای قرمز رنگ و روستروم قهوه ای ، بلند، کشیده و هلالی شکل که تاج روستروم آن نیز کم ارتفاع و راست می باشد.

در قسمت بالای آن دارای ۹-۷ دندانه و قسمت زیرین روسترم دارای ۵-۴ دندانه است که یکی از مهمترین شاخص در تشخیص این از سایر گونه ها وجود آنتن بلند و شیری رنگ است (مسندانی، ۱۳۷۵).

تولید مثل

میگوی سفید هندی از نظر جنسیت اصطلاحا جنس جدا بوده و دستگاه تولید مثل آنها از یکدیگر متمایز است جنسیت در آن با توجه به شکل اندامهای تناسلی به راحتی قابل تشخیص می باشند. دستگاه تناسلی در جنس نر که پتاسما نامیده می شوند بین اولین جفت پاهای شنا قرار داشته که عمل انتقال کیسه های اسپرم را به اندام تناسلی ماده انجام می دهد همچنین دستگاه تناسلی در جنس ماده تلیکوم نامیده می شود که بین چهارمین و پنجمین جفت از پاهای حرکتی قرار دارد که وظیفه آن نگهداری اسپرماتوفورهایی است که پس از عمل جفت گیری از میگوی نر به میگوی ماده انتقال یافته اند. این گونه جزء گروه تلیکوم بسته می باشد که قادر است اسپرماتوفر را برای مدت بیشتر نگهداری نماید(دندانی، ۱۳۷۵).

۲-۲-۵ -۱: میگوی موزی*penaeus merguiensis*

شکل۲ : میگوی موزی

(SFC International Ltd)

پراکنش زیستی:

الف- پراکنش در جهان

بیشتر در جنوب شرقی آسیا ، تایلند، سنگاپور، اندونزی ، مالزی، خلیج فارس و دریای عمان می باشد و در اقیانوس هند و قسمتهای مرکزی اقیانوس آرام نیز یافت می شود. همچنین در طول سواحل شمال چین ، هنك کنگ، فلیپین ، استرالیا و نیوزلند نیز گسترش دارد(Holithuis 1980).

ب - پراکنش در آبهای ایران

از محدوده جزیره قشم در استان سیستان و بلوچستان گسترده است و پراکنش آن در آبهای استان هرمزگان از منطقه تولا در غرب تا آبهای ساحلی منطقه جاسك در شرق می باشد میگوی موزی در این مناطق تا عمق ۳۰ متر وجود دارد اما بیشترین تراکم را در اعماق ۱۰ تا ۱۵ متر دارد .این گونه بیشتر بسترهای گلی و گلی – شنی و آبهای نیمه شفاف و یا گل آلود را ترجیح می دهد (کامرانی و خضرائی نیا، ۱۳۷۳).

مورفولوژی

میگوی موزی از نظر شکل ظاهری بدن به رنگ متمایل به صورتی تا زرد کمرنگ و با لکه هایی به رنگ سبز – خاکستری تا خاکستری – آبی، پاهای حرکتی مشابه رنگ آمیزی بدن و پاهای شنا صورتی متمایل به زرد تا قرمز رنگ و بخش های انتهایی پاهای دمی سبز یا قرمز رنگ و لبه ها و حاشیه آنها قرمز رنگ می باشد. روستروم مجهز به ۹-۶ دندانه و در سطح پشتی و ۶-۳ دندانه در سطح شکمی می باشد.

در جنس نر ، پتاسما دارای زائده انتهایی میانی بر آمده نسبت به حاشیه های آن و سطح خارجی لوب های جانبی پتاسما مجهز به توبرکولهای کوچک در یک ردیف می باشد.
در جنس ماده تلیکوم دارای صفحات جانبی بوده که در سطح داخلی آنها برجستکیهای زگیل مانند مشاهده می شود و قسمت میانی آن متورم است. صفحه قدامی در انتها مدور شده و بخش خلفی آن بطور ناقص آهکی شده و اغلب بطور کامل وارد فضای مابین صفحات جانبی می گردد(صفایی، ۱۳۸۰).

تولید مثل

میگوی موزی در تمام طول سال تخم ریزی می کند ولی مانند سایر گونه های مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیری دارای دو اوج تخم ریزی، یکی در بهار و دیگر در پاییز مباشد. اوج تخم ریزی آن در آبهای ساحلی استان هرمزگان در اردیبهشت ماه و خرداد ماه رخ می دهد(زرشناس، ۱۳۷۰)
تخم ریزی این میگو عمدتا در دریا و اعماق ۱۰ تا ۲۵ متر صورت می گیرد که قبل از تخم ریزی ، نر با ماده جفت گیری نموده و کیسه های اسپرم (Spermatophores) که حاوی اسپرماتوزا هستند را درون اندام تناسلی جنس ماده(Thelycum)قرار میدهد و جنس ماده قبل از تخم ریزی ،اسپرماتوفورها را برای مدتی حمل می کنند و تخم ریزی در شب صورت می گیرد. (کامرانی، ۱۳۷۴).

۳-۲-۵-۱ میگوی سر تیز

میگوی سر تیز *Metapenaeus affinis* (H. Milne Edwards, 1837) با نام انگلیسی Jinga shrimp رتبه دوم صید را در استان هرمزگان پس از گونه میگوی موزی دارا می باشد (صفایی، ۱۳۹۱).

رده بندی این گونه به صورت ذیل می باشد (www.marinespecies.org):

Kingdom: Animalia
Phylum: Arthropoda
Subphylum: Crustacea
Class: Malacostraca
Subclass: Eumalacostraca
Superorder: Eucarida
Order: Decapoda
Suborder: Dendrobranchiata
Superfamily: Penaeoidea
Family: Penaeidae
Genus: Metapenaeus
Species: *Metapenaeus affinis* (H. Milne Edwards, 1837)

میگوهای خانواده پنائیده در آبهای استوایی و نیمه استوایی در سراسر جهان یافت می شوند. پراکنش گونه میگوی سر تیز در آبهای خلیج فارس و دریای عمان تا آبهای جنوبی هند و همچنین در آبهای سریلانکا می باشد. پراکنش آنها در شرق تا آبهای فیلیپین و جزیره تایوان نیز ادامه می یابد. میگوی سفید در سراسر خلیج فارس در مناطق خوزستان، بوشهر و هرمزگان پراکنش دارد.

مشخصات ریخت شناسی میگوی سر تیز

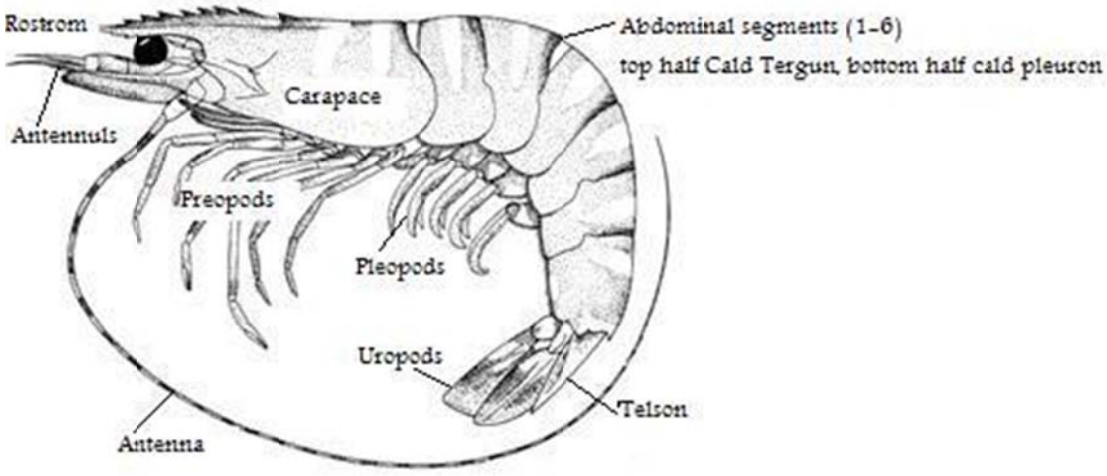
رنگ عمومی بدن این میگو سبز کم رنگ تا صورتی کم رنگ و گاهی متمایل به قهوه ای است. قسمت انتهایی بدن به رنگ قرمز می باشد. پاهای شنا مایل به صورتی تا سفید، دم پاره ها سبز و انتهای آن سفید متمایل به زرد است. شاخک های حسی قرمز رنگ بوده و پاهای حرکتی سفید و یا همرنگ بدن می باشند.

آنتن ها نسبتاً بلند و زاویه دار و به رنگ قرمز می باشند. روستروم بلند و نوک تیز بوده و قسمت بالایی آن دارای ۸ تا ۱۱ دندانه و قسمت پائینی فاقد دندانه است. رنگ نوک اندام یوروپود معمولاً سفید یا زرد متمایل به سبز می باشد. برجستگی Postrostral تقریباً تا انتهای خلفی کاراپاس (سرسینه) ادامه دارد و تلسون فقط مجهز به خار انتهایی می باشد. دومین تا چهارمین پای حرکتی فاقد پای خارجی می باشد. در جنس نر، قطعه انتهایی میانی پتاسما (اندام تناسلی) هلالی شکل بوده به طوری که تمام یا قسمتی از قطعه انتهایی جانبی را می پوشاند.

در جنس ماده، صفحه قدامی از تلیکوم (اندام تناسلی) دارای شیار عمیق طولی بوده و به طور قابل ملاحظه ای پهن تر از صفحه خلفی می باشد . همانند سایر گونه های پرورشی، ماده ها از نرها بزرگترند. حداکثر طول ماده ها ۱۹ و نرها ۱۵ سانتی متر است (FAO, 1985).

شکل ۳- نمای کلی بدن میگوی سر تیز *Metapenaeus affinis* (H. Milne Edwards, 1837)

۴-۲-۵-۱ : پنائئوس سمی سولکاتوس.*Penaeus semisulcatus* (De Hoan, 1844)



شکل ۴: نمای کلی بدن میگوی ببری سبز.(Holthuis, 1980)

رده بندی این گونه به صورت ذیل می باشد :(Holthuis, 1980)

Phylum: Arthropoda
Class: Crustacea
Series: Eumalacostraca
Superorder: Eucarida
Order: Decapoda
Suborder: Natantia
Infraorder: Penaeidea
Superfamily: Penaeoidea
Family: Penaeidae
Genus: *Penaeus*
Subgenus: Penaeus
Species: *Penaeus semisulcatus*

این گونه که اغلب آن را یکی از مرغوبترین میگوهای خوراکی میدانند و ارزش اقتصادی بالایی دارد، بیش از 90 درصد صید میگو در خلیج فارس را به خود اختصاص میدهد. پراکنش جغرافیایی میگوی ببری سبز به عنوان یک گونه متعلق به آبهای گرم، وسیع و پهنه آن از افریقا تا استرالیا امتداد دارد. علی رغم اهمیت اقتصادی قابل توجه میگوی ببری سبز در خلیج فارس، دانش ما در مورد ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیتهای این گونه ناچیز خصوصیات مورفولوژیکی مانند اندازه، شکل و تعداد دندانهها ی روستروم، شکل آنتن شلاقی، کاراپاس و خصوصیات اندامهای

تناسلی نر و ماده بویژه اندام جنسی ماده تلیکوم مواردی هستند که برای مطالعه جمیتهای میگوی ببری سبز در نظر گرفته شد. براساس خصوصیات ریختی کاراپاس، اندامهای جنسی نر و ماده، آنتنها و همچنین الکتروفورتیک بافتهای مختلف، زیر گونه جدیدی از میگوی ببری سبز در آبهای شمالی خلیج فارس شناسایی گردید که معرفی شد تحت عنوان *P.(penaeus) semisulcatus persicus*. دو تفاوت ریختی که تشخیص گونه و زیر گونه فوق را از همدیگر متمایز مینماید، الگوی رنگبندی بدن و آنتن شلاقی است. رنگ بدن در گونه متمایل به قرمز، دارای نوارهای عرضی قرمز تند یا قهوهای رنگ، حاشیه زوائد بدن به رنگ زرد یا آبی است، ولی در زیر گونه رنگ بدن صورتی متمایل به کرم، فاقد نوارهای عرضی مشخص، حاشیه زوائد بدن به رنگ قرمز کم رنگ است. در گونه آنتن شلاقی مخطط به رنگ کرم و قهوهای است ولی در زیر گونه آنتن شلاقی یک دست کرمرنگ است.

۵-۲-۵-۱ پنائئوس مونودون : *Penaeus monodon*

phylum = Arthropoda
| subphylum = Pancrustacea
| infraphylum = Crustaceomorpha
| superclassis = Crustacea
| epiclassis = Eucrustacea
| classis = Malacostraca
| subclassis = Eumalacostraca
| superordo = Eucarida
| ordo = Decapoda
| subordo = Dendrobranchiata
| superfamilia = Penaeoidea
| familia = Penaeidae
| genus = Penaeus
| species = **P. monodon** |

شکل ۵: پنائئوس مونودون

شناسایی:

Penaeus monodon برای اولین بار توسط یوهان کریستین فابریسیوس در ۱۷۹۸ معرفی گردید. این نام برای یک مدت طولانی نادیده گرفته شده بود،

این گونه از مهمترین میگوهای پرورشی است ویکی از درشت ترین آنهاست . اندازه ماده ها ۳۳/۷ و نرها ۲۶/۸ می رسد.وزن آنها تا ۱۵۰ گرم میرسد .این میگو ها رشد سریع ودر برابر بیماری هاو شرایط محیطی مقاومتر است.دامنه تحمل شوری بین ۲۵-۵ وحتی در آب شیرین تا مدت کمی تحمل دارند ، درجه مناسب آب بین ۳۴-۲۴ می باشد .

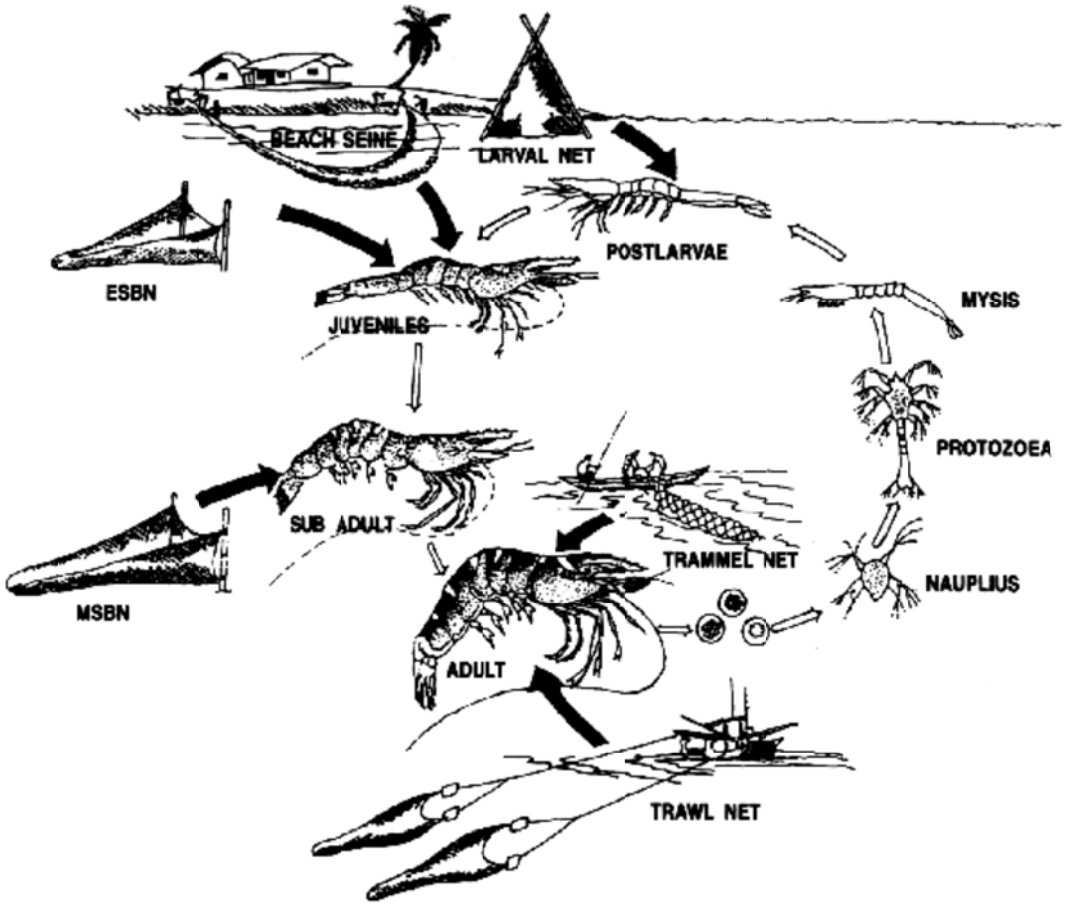
میگو های ببری سیاه بومی سواحل شبه جزیره عربستان و اقیانوسیه و اقیانوس هند سواحل استرالیا، اندونزی، جنوب و جنوب شرقی آسیا و آفریقای جنوبی هستند. آنها به طور تصادفی به ایالات متحده در سواحل کارولینای جنوبی در سال ۱۹۸۸، توسط انتشار غیر منتظره از یک مرکز آبزی پروری معرفی شدند. و تا جنوب خط ساحلی فلوریدا در سال ۱۹۹۰ گسترش یافتند و از سال ۲۰۰۶، در خلیج مکزیک یافت شده است. آنها در امتداد سواحل آلاباما، فلوریدا، گرجستان، لوئیزیانا، می سی سی پی، کارولینای شمالی، کارولینای جنوبی و تگزاس پیدا شده است.

میگو های ببری سیاه جوان به طور معمول در مصب رودخانه ها، تالاب ها و جنگل ها یافت. آنها بسیار متحمل به طیف وسیعی از سطوح شوری ۲-۳۰ PPT هستند. بزرگسالان به آب های عمیق تر حرکت می کند و در بستر سنگی و یا گل آلود زندگی می کنند، اعم در عمق ۰-۱۱۰ متر (اغلب در ۲۰-۵۰ متر) است. آنها در آب اعم ۲۸-۳۳ $^{\circ}$C زندگی می کنند و حضور این گونه در آب سردتر از ۱۳ $^{\circ}$C عیر محتمل می باشد.

۶-۱ - نقش مهاجرت در ایجاد اختلاف ژنتیکی گونه های میگوی خانواده پنائیده

میگوهای خانواده پنائیده در دریا تخم ریزی نموده و لاروهای خارج شده از تخم از مناطق دریایی به مناطق ساحلی و خوریات پوشیده از جنگل های حرا مهاجرت می کنند. مهم ترین مکانیزم مهاجرت لارو میگو از دریا به مناطق ساحلی و خوریات حرا، جریانهای دریایی است. معمولاً در این حالت شرایط محیطی مانند درجه حرارت، شوری و بارندگی بر اندازه و فراوانی میگوها در این مناطق تاثیر گذار هستند. لاروها در خوریات در زیر درختان حرا و کنار ریشه های هوایی قرار می گیرد و از فیتوپلانکتونها (مانند دیاتومه ها)، ذرات دیتریت، ماکروفیت‌ها، روزنه داران، کرمهای حلقوی، پرتاران، نرمتنان و سخت پوستان کوچک تغذیه می کند. میگوها بین یک تا دو ماه در خوریات مانده و سپس به سوی سواحل شنا کرده و بعد از رسیدن به سن بلوغ به شکل گله های بزرگ، سواحل را به سمت دریای آزاد ترک می کنند (Garcia and Reset 1981)

جمعیت میگوها از زمان لاروی به علت تغییرات محیطی و شکار شدن به وسیله سایر آبزیان به شدت کاهش می یابد. از طرفی وزن هر میگو با افزایش سن بیشتر می گردد. بنابراین میزان توده زنده (بیوماس) که حاصل تعداد میگوها در وزن آنها می باشد تا یک سن مشخص بیشتر شده و سپس کاهش می یابد. این سن به عنوان سن بحرانی شناخته می گردد و چنانچه سن ذخیره آبزی از آن بگذرد توده زنده کاهش خواهد یافت. زمان آزاد سازی فصل صید دقیقاً در زمان این سن بحرانی آغاز می گردد.



شکل ۶ :چرخه زندگی عمومی میگو های خانواده پنائیده وبا توجه به روشهای مختلف صید در هر مرحله

(Khan & Latif ,1995)

۱-۶-۱- چرخه زندگی میگوهای خانواده (Penaeidae)

براساس نحوه زیست میگوهای خانواده (Penaeidae) به دو گروه اصلی مهاجر و خزنده تقسیم بندی می شوند:

الف – گروه مهاجر (Wondering group)

گونه های این گروه در دسته های سنی متفاوت و به صورت گله های متراکم همیشه در حال حرکت هستند و در تمام طول شبانه روز فعالند. این گروه، آبهای کدر که دارای بستری با گل نرم است را ترجیح می دهند. یکی از گونه های شاخص این گروه F.orientalis می باشد که در دریای زرد زیست می کند و مهاجرتهای ۱۳۰۰ – ۷۰۰ کیلومتری بین مناطق زمستان گذرانی و منطقه تخم ریزی را انجام وی دهد. میگوی موزی و میگوی سفید هندی که

بیشتر در منطقه آسیای جنوب شرقی زیست می کنند و به دوره زمستان گذرانی نیاز دارند.جزء این گروه هستند. میگوی سفید هندی و میگوی موزی معمولا زندگی خود را در اعماق ۳۰ – ۷ متری ودر آبهای ساحلی و بیشتر در نزدیکی محل طی شدن دوران نوزادی لاروها می گذرانند.(مومنی و همکاران، ۱۳۸۹)

ب – گروه خزنده یا حفار (Burrowing Group)

این گروه زیستگاههای شنی را ترجیح می دهند . و بیشتر در شبها فعالیت دارند ، در حالیکه در طول روز به درون لایه های شنی کف آب رفته و پنهان می شوند . جستجوی غذا بیشتر در شب انجام می گیرد . P.semisulcatus و P. monodon جزء این گروه می باشند. (دندانی، ۱۳۷۵).

۲-۶-۱ مراحل تکاملی جنینی میگوی خانواده (Penaeidae)

الف – تخم

بعد از اینکه میگوی نر و ماده جفت گیری کردند و میگوی نر اسپرماتوفورها را در مخزن اسپرم میگوی ماده قرار داد، میگوی ماده آماده تخم ریزی می شود. تخم ریزی میگوی ماده بر حسب گونه ، در مناطق مختلف انجام می شود. قطر تخم ها معمولا ۰/۲۶ – ۰/۳۸ میلیمتر است . تعداد تخمی که هر میگوی ماده تولید می نماید . متفاوت و بسته به گونه و اندازه میگو و شرایطی که در آن بسر برده است تغییر می نماید میگوهای پنائیده عموما باروری بالایی دارند واز ۱۰۰۰۰۰ تا بیش از ۱۰۰۰۰۰۰ تخمک در هر بار تخم ریزی تولید می کنند . رابطه مستقیمی بین اندازه میگوی ماده و مقدار تخمک وجود دارد بطوریکه میگوهای بزرگتر عموما بیش از کوچکترها تخمک تولید می کنند، با لقاح تخمک و اسپرم سلول تخم ایجاد می شود تخم ها در ابتدا نا منظم است اما ۴ تا ۵ دقیقه پس از لقاح شکل کروی بخود می گیرند.

این تغییرات بواسطه جذب آب و همچنین ایجادلایه حفاظتی ژله مانندی است که از ورود چند اسپرم به یک تخمک جلوگیری می نماید . شروع تقسیمات سلولی بسته به درجه حرارت و شوری متفاوت است و معمولا پس از حدود ۴۰ دقیقه اولین تقسیم سلولی انجام می پذیرد . پس از حدود ۱۳ تا ۱۸ ساعت جنین مراحل تکوین خود را کامل نموده و پس از تخم کشایی ، لارو اولیه که ناپلیوس نامیده می شود از آن خارج می گردد.(مومنی و همکاران، ۱۳۸۹)

ب – مرحله نائوپلیوس(Nauplius)

اولین مرحله لاروی بعد از گشایی نائوپلیوس نام دارد که خود شامل ۶ زیر مرحله است. در این مرحله لارو پنج مرحله پوست اندازی دارد و بعد از پوست اندازی ششم وارد مرحله بعدی مرحله بعدی لاروی می شود. اندازه نائوپلیوس بین ۰/۳۲ – ۰/۲۸ میلیمتر است و بدن آنها یک قطعه ای است. نائو پلی دارای سه زوج زائده است زوج اول جلوی دهان قرار دارد و بعدا تبدیل به آنتنول می شود. زوج دوم در کنار دهان قرار دارد ودر حیوان بالغ تبدیل به آنتن می شود. بعد از ۲۰ دقیقه حرکات آن تند می شود و نسبت به نور واکنش مثبت نشان می دهد. نائوپلی فاقد حفره دهانی ذو مخرج است و برای تغذیه از باقیمانده زرده استفاده می کند. در زیر مرحله های نائوپلوس، پوست اندازی مکرر و افزایش طول ،افزایش تعداد مویچه ها بر روی بدن ، افزایش دو شاخه شدن قسمت انتهایی و تکامل زوائد شکمی صورت می گیرد. در پایان این مرحله طول نائوپلی تقریبا ۵۰۰ میکرون است. پوست اندازی ششم و ورود به مرحله بعدی یعنی پروتوزوآ ۳۶ – ۳۰ ساعت بعد صورت می گیرد. در پایان این مرحله تعداد زوائد لارو به هفت زوج می رسد. (مومنی و همکاران، ۱۳۸۹).

ج – مرحله پروتوزوآ یا زوآ(Protozoae or Zoae)

این مرحله خود شامل سه زیر مرحله است و سه بار پوست اندازی را در بر می گیرد بعد از پوست اندازی سوم که حدودا ۵ – ۳ روز به طول می انجامد لارو این مرحله را طی می کند . یکی از مهمترین مسائل مورد توجه در این مرحله ، شروع تغذیه میگو است رفتار شنای میگو دچار تغییراتی می شود و رفتار شنای میگو دچار تغییراتی می شود و شنای میگو ممتد می شود و بدین وسیله به جستجوی غذا می پردازد. نوزاد میگو در این مرحله قادر است از ذرات غذایی معلق و پلانکتونهای موجود در آب که اندازه آنها بین ۳۰ – ۳ میکرون است، تغذیه کند.عدم امکان تغذیه لاروها در این مرحله باعث مرگ و میر سریع می شود. به همین دلیل در مراکز تکثیر زمانی که لارو در مرحله N5 قرار دارد فیتوپلانکتون های ریز را وارد محیط می کنند تا در زمان حصول زوآ، غذای مناسب در محیط فراهم باشد.

اولین مرحله پروتوزوآ که Z1 نام دارد، فاقد چشم مرکب است ودر خاتمه مرحله Z1 چشم مرکب پدیدار می شود. همچنین در این مرحله نیمه انتهایی بدن که بعدا به بخش شکم تبدیل خواهد شد، بصورت ۶ قطعه ای، کاملا دراز، استوانه ای و باریک است و فاقد پوسته سخت خارجی می باشد. تلسون در این مرحله کاملا رشد کرده و بدن قابل تفکیک به دو بخش اصلی است. در مرحله Z2 چشمها کاملا برجسته می شود و بر روی پایه های چشمی قابل تشخیص است. روستروم رشد می کند که در قسمت جلوی کاراپاس قابل مشاهده است. در مرحله Z3 دم پاره ها در انتهی بدن رشد می کنند و همزمان خارهایی بر روی بندهای ناحیه شکمی ظاهر می شود. (مومنی و همکاران، ۱۳۸۹).

د – مایزیس (Mysis)

نوزاد میگو پس از پوست اندازی نهم خود وارد این مرحله می شود. در این مرحله نوزاد میگو کم کم حرکت به سمت کف و بستر را شروع می کند . در محیط طبیعی مایزیس از زئوپلانکتونها تغذیه می کند و قادر است از نائوپلی آرتمیا و روتیفرهای کوچک نیز تغذیه کند. در این مرحله دارای سه زیر مرحله است و حدودا سه روز به طول می انجامد.

بعضی از محققین این مرحله را شامل چهار زیر مرحله مدانند. در آخرین زیر مرحله پاهای شنا کاملا رشد یافته و بند بند می شوند و گاهی لاروها در این مرحله کاملا در بستر ساکن می شوند. در محیط طبیعی نوزاد میگو پس از رسیدن به این مرحله، به تدریج حرکت خود را به سمت سواحل ، خورها و جنگلهای حرا (Mangrove) شروع می کند در پایان این مرحله نوزاد میگو تقریبا به شکل میگوی بالغ است. (مومنی و همکاران، ۱۳۸۹).

ه – مرحله پست لاروی(پس نوزادی) (Postlarvae)

نوزاد میگو در این مرحله به شکل موجود بالغ است. اگر چه هنوز اندازه آن کوچک است مرحله چرخه زندگی آن به اتمام رسیده است و به علت مهاجرت خود به آبهای کم عمق ساحلی می رسد. رنگ بدن آن شفاف است و از غذاهای جانوری مانند روتیفر، نائوپلی آرتمیا و سایر پلانکتونهای جانوری استفاده می کند. تعیین سن پست لارو بر اساس روزهایی که نوزاد میگو در این مرحله سیر می کند ، تعیین می شود. به این معنی که به ازاء هر روز که از عمر پست لارو می گذرد ، یک شماره به مراحل طی شده پست لاروی اضافه می گردد.بتدریج که بر عمر پست لارو اضافه می شود، از شفافیت بدن کاسته شده و رنگ آن تیره تر می گردد. نوزاد پست لارو قابلیت تحمل تغییرات شرایط محیطی را دارد و به همین دلیل نوسانات شوری و دما موجود در زیستگاههای ساحلی را به راحتی پشت سر می گذارد. دلایل مختلفی برای تمایل پست لارو به زیست در این مناطق بیان شده است که می توان به مواردی همچون غریزه طبیعی،جریان جزر و مد ، وزش باد و نیز شنای میگو نسبت داد. در ادامه مراحل تکاملی و زمانی که بچه میگو به والدین خود شبیه شد،وارد مرحله جوانی (Juvenile) می شود. در این مرحله بچه میگوها به صورت توده های بزرگ ، حرکت به سمت دهانه خورها و خلیج را شروع کرده و به سمت مناطق عمیقتر بزر می گردند. در انتها این مسیر مهاجرتی میگوها به مرحله پیش بلوغ می رسند. در مرحله جوانی دندانی روستروم کامل می شود و بچه میگو تمام خصوصیات میگو بالغ به غیر از اندامهای تناسلی را دارا می باشد. بقیه مراحل زندگی میگو در این مناطق سپری می شود و میگوی بالغ پس از جفت گیری و تخم ریزی مناطق عمیق یک چرخه جدید زیستی را پایه گذاری می کند. (صفایی، ۱۳۸۰ ،کامرانی، ۱۳۷۴).

۷-۱ - تکنیکهای مولکولی و کاربرد آنها جهت بررسی جمعیتها و تکثیر و پرورش آبزیان

کاربرد وسیع تکنیکهای مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی یا تنوع جمعیتی در مقایسه با سایر روشهای معمول و کلاسیک نشان دهنده مزایای این تکنیکها می‌باشد. به علت نشان دادن تنوع و تفاوتهای بیشتر و نیز عدم تأثیر عوامل محیطی بر نتایج این تکنیک این روش و تکنیک را متمایز ساخته است. روشهای مولکولی بخاطر اینکه دارای قدرت تمایز بالاتر بوده و عوامل محیطی تاثیری در نتایج بکارگیری این شیوه‌ها ندارد مورد توجه محققین زیادی در دنیا قرار گرفته‌اند .

عملکرد و فعل و انفعالات طبیعی سلولی در محیط زیست ممکن است در نتیجه موتاسیونها یی باشد که در ارگانیسم رخ میدهد که این امر منجر به ایجاد اختلافات ژنتیکی یا همان پلی مورفیسم میگردد.

تنوع درترکیب ژنتیکی موجود ممکن است در اثر انتخاب یا رانش ژنتیکی باشد. این گونه تنوع های ژنتیکی میتواند در اندازه های گوناگونی از جمله در بین نمونه ها ، گونه ها و رده های بالاتردرطبقه بندی موجود رخ دهد.

برای آنکه روند ایجاد تنوع حالتی سودمند بخود بگیرد ، میبایست این تنوع قابل توارث بوده و به راحتی توسط محقق از طریق شناخت تنوع فنوتیپی و یا از طریق استفاده ار تکنیکهای ملکولی قابل ردیابی باشد.
(Liu and Cordes, 2004)

در ماهی و دیگر گونه های مهم در تکثیر و پرورش ، مارکر های آلوزایمی در جهت شناخت مولدین بصورت گسترده ای مورد استفاده قرار میگرفت .(Kucuktas & Liu, 2007).(الوزایم ها فرم هایی از آلل های اختصاصی از آنزیم های مشابه هستند که درجایگاه های ژنی یکسان واقع شده اند.(Parker et al 1998; May 2003) . با این وجود ، با پیشرفت تکنیک های جدید ، مخصوصا تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ، مارکر های دیگری بصورت کامل جایگزین تکنیک استفاده از مارکر های آلوزایمی گردید. این مارکرها اطلاعات غیر قابل تصورو ارزشمندی را برای استفاده در جنبه های مختلف تکثیر و پرورش آبزیان در اختیار محققین قرار داد. این اطلاعات شامل شناسایی و تفکیک ژنتیکی ذخایر ، برنامه های به گزینی مولدین و اندازه گیری میزان تغییرات کروموزومی و ژنتیکی در زمینه های القاء پلی پلوییدی در مولدین بوده است (Ferguson, 1994) .

انواع مختلفی از مارکرهای ملکولی هم اینک بصورت گسترده درتعین ژنتیک آبزیان مورد استفاده قرار میگیرند.

این مارکر ها شامل Mitochondrial DNA (mtDNA) ، Randomly Amplified Polymorphic DNA یا RAPD ، Amplified Ffragment Length Polymorphism یا AFLP، Restriction Fragment Length Polymorphism یا RFLP و در آخر مارکرهای میکروساتلایت قرار میگیرند که این مارکرها تنوع را بصورت گسترده تری نشان میدهند. (Liu and Cordes, 2004).

مارکر های ملکولی بصورت عمده در دوگروه قرار میگیرند. گروه اول شامل مارکرهایی هستند که نقاط خاصی از ژنوم موجود را با فعالیت مشخص پوشش داده و ردیابی میکنند (مارکر های نوع ۱) ، ودیگر مارکر ها آنهایی هستند که نقاطی از ژنوم را با فعالیت نامشخص پوشش میدهند و در اصطلاح به آنها مارکرهای راندم میگویند.(مارکر های نوع ۲) .(Liu and Cordes, 2004) .

بر پایه این طبقه بندی ،مارکر های RFLP در گروه اول قرار میگیرند زیرا نقاط خاصی از ژنوم موجود را با استفاده از آنزیمهای محدود الاثر را میتوان ردیابی کرد. مشخصا مارکر های آلوزایمی هم در این گروه قرار میگیرند. زیرا پروتیین هایی را با عملکرد مشخص ردیابی میکنند (Liu and Cordes, 2004) .

مارکر های RAPD در گروه دوم از این طبقه بندی قرار میگیرند زیرا باندهای RAPD با استفاده از عمل PCR از نقاط غیر مشخص از ژنوم موجود بدست آمده و بصورت اتفاقی ردیابی شده اند. مارکر های میکروساتلایت هم در گروه دوم از این طبقه بندی قرار میگیرند مگر اینکه ژنی را با عملکرد مشخص ردیابی نمایند. مارکر های AFLP نیز از انجا که نقاط غیر مشخصی از ژنوم موجود را شناسایی و ردیابی میکنند در گروه دوم قرار میگیرند . (Liu and Cordes, 2004)

در مقایسه با مارکرهای RAPD ، مارکرهای AFLP قدرت بالاتری را در تفکیک ژنومی موجود از خود نشان میدهند زیرادر تکنیک استفاده از روش AFLP به هیچ تاریخچه و اطلاعات قبلی از ژنتیک موجود احتیاج نداشته وکمبود نتاج در بررسی ژنومی موجود تاثیر آنچنانی ندارد.

Kai et al. (2002) از ۱۴ مارکر AFLP جهت تفکیک ۳ مورفوتایپ از ماهی صخره ای سیاه که از لحاظ رنگ با هم اختلاف داشتند سود برد.

جدول ۱ : -خلاصه ای از ابزارهای ژنتیکی موجود و قدرت کارایی آنها (نوروزی ، م، ۱۳۸۶)

تکنیک	Allozyme	Microsatellite	mt DNA
شناسایی فردی	++	+++	+
خویشاوندی	++	+++	+
ژنتیک جمعیت	+++	+++	++
ذخایر	++	+++	+++
بین گونه های خویشاوند نزدیک	++	+	+++
شناسایی گونه ها	++	+	+++
نسبتهای فیلوژنتیک	+	-	+++

۱-۷-۱ - تکنیک PCR (Polymerase chain reaction)

PCR روشی است که در آن یک قطعه خاصی از DNA در داخل لوله آزمایش و در شرایط کاملاً آزمایشگاهی تکثیر می شود. این روش که از کارایی بسیار بالایی برخوردار می باشد در سال ۱۹۹۸ توسط کری مولیس (Kary mullis) معرفی شد. در این روش بکارگیری آنزیمهایDNA polymerase جهت شروع و ادامه گپی برداری از قطعات معین شده ژنوم و یا قطعات نا معین از ژنوم که بستگی به اختصاصی بودن آغاز گرما داردضروری می باشد. با این روش مقدار DNA ساخته شده بصورت تصاعدی افزایش می یابد بطوری که پس از تکرار دوره‌های حرارتی مقدار DNA بسته به تعداد دوره‌های تکرار شده افزایش مییابد.

n– تعداد دوره‌های حرارتی تکرار شده

جهت سنتز DNA و آغازگر بکارمی رود که از دو قسمت به دو رشته مقابل هم در DNA دو رشته ای متصل می شوند. واکنش PCR با حرارت دادن نمونه DNA دو رشته ای تا حدود ۹۵ درجه سانتی گراد شروع می شود با این عمل دو رشته DNA از همدیگر جدا می شوند. سپس درجه حرارت به منظور اتصال آغازگرها به توالی‌های معین از قطعه مورد تکثیر کاهش پیدا می کند . پس از این عمل آنزیم DNA polymerase جهت ساخته شدن رشته‌های جدید مورد استفاده آغازگرها قرار می‌گیرد. حاصل یک دوره از فرایند تکثیر شامل دو مولکول DNA از مولکول DNA الگو می‌باشد. این فرایند می تواند چندین بار تکرار شود و در هر بار تکرار دوره‌های حرارتی قطعات حاصل دو برابر مولکولهای مورد تکثیر اولیه خواهد بود (Copper, 1997).

۱-۷-۲ مراحل انجام واکنش PCR

- مرحله واسرشته سازی (Denaturation):

چون سنتز DNA به وجود رشته‌های منفرد الگو نیاز دارد، لذا DNA باید در هر چرخه در درجه حرارت بالا واسرشته شود (حدود ۹۵ درجه سانتی گراد). این دما برای فایق آمدن بر پیوندهای هیدروژنی بین جفت بازها در دو رشته DNA لازم است .

- مرحله اتصال آغازگرها به رشته الگو (Annealing):

رشته‌های منفرد DNA چنانچه به آرامی سرد شوند مجدداً به همدیگر اتصال پیدا می کنند. در فرایند PCR هرآغاز پس از واسرشته شدن DNA الگو به توالی مکمل خود در رشته مخالف می چسبد.

آغازگرها طوری جهت گیری می کنند که تمام ناحیه بین آنها توسط آنزیم DNA polymerase تکثیر شود. در این صورت وقتی اتصال بازی بین توالی آغازگر و توالی مکمل آن در DNA الگو برقرار شود، oH – ′۳ در مقابل

همدیگر قرار خواهند گرفت . این موضوع ما را مطمئن می سازد که سنتز DNA از سمت هر آغازگری بسمت آغازگر مقابلش صورت خواهد گرفت.

دما، pH و غلظت نمک در مخلوط واکنش پیوستن آغاز گرها به DNA تک رشته ای را تسهیل می‌کنند.

- مرحله بسط یا تکثیر (Extention):

ایجاد رشته های جدید وابسته به میزان فعالیت آنزیم پلی مراز است. این آنزیم در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بیشترین فعالیت را نشان می دهد. عواملی مثل کاتیونهای دو ظرفیتی (+Mg2) در فعالیت این آنزیم بسیار موثرند. مقادیر کم این کاتیونها مانع فعالیت مطلوب آنزیم می شود و افزایش بیش از حد آنها سبب اتصالات نابجا و گاهی اوقات عدم فعالیت آنزیم خواهد شد. آنزیم پلی مراز زمانی سنتز DNA را آغاز می کند که DNA به شکل دو رشته ای باشد (در امتداد آغازگرها). بدین ترتیب عمل سنتز از جایگاه های دو رشته ای به پیش می‌رود و رشته‌های جدید از جهت ´5 به سمت ´3 در امتداد DNA همانند سازی می شوند.

صحت نتایج PCR بستگی به انتخاب پرایمر مناسب دارد. پرایمرها قطعات کوچک پلی نوکلئوتیدی هستند و در آزمایشگاه به گونه‌ای طراحی و سنتز شده‌اند که دارای توالی نوکلئوتیدی مکمل با ناحیه ´۳ در مولکول DNA مورد نظر هستند. بنابراین بطور اختصاصی فقط به این مولکول ها متصل می شوند. چون آنزیم DNA پلیمراز به قطعات پرایمر متصل می‌شود، در نتیجه فقط مولکول DNA هدف همانند سازی و تکثیر می‌گردد. با اعمال تغییرات دمایی به طور متوالی و برنامه ریزی شده، روند PCR تکرار گردیده و در هر مرحله DNA دو برابر می‌شود. بنابراین تعداد مولکول های DNA بصورت تصاعدی و به نسبت 2^n افزایش می‌یابد که n تعداد سیکل‌های دمایی است. تولید و افزایش زنجیره‌های جدید در روند واکنش تا سیکل سوم بصورت تصاعد حسابی و از آن به بعد تا سیکل آخر به شکل تصاعد هندسی است. مثلا یک مولکول DNA، پس از ۲۰ سیکل به ۱،۰۴۷،۵۸۶ مولکول تکثیر می‌شود.

در مرحله همانندسازی، برای جدا نگه داشتن دو رشته DNA، باید دمای محلول بالا باشد. بنابراین از یک نوع آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت استفاده می‌شود. اولین آنزیمی که بدین منظور مورد استفاده قرار گرفت Taq polymerase بود که از باکتری *Thermus aquaticus* به دست می‌آید. مزیت Taq پلیمراز این است که باعث می شود PCR به صورت اتوماتیک انجام شود و با افزودن یکبار این آنزیم دیگر نیازی به اضافه کردن مجدد آن نباشد. مزیت بسیار مهم دیگر پلیمراز افزایش حساسیت و دقت PCR می‌باشد (گاون[1] و همکاران، ۲۰۰۴). سرعت و حساسیت زیاد و توانایی تولید مقادیر قابل توجه ماده ژنتیکی حتی از مقادیر کم و یا نامناسب ژنوم سلولی، از مزایای مهم روش PCRبه عنوان یک روش تکثیر غیر سلولی ماده ژنومی است.

[1] Guven

محلول PCR حاوی مواد زیر است:

۱- DNA الگو: شامل DNA هدف است که تکثیر می‌گردد.

۲- پرایمرهای Forward و Reverse: به گونه‌ای طراحی شده‌اند که هر یک مکمل ناحیه ´۳ در یکی از رشته‌های DNA باشند. این پرایمرها دو کار انجام می‌دهند: الف: محل ژنی که باید تکثیر شود را مشخص می‌کنند، ب: اندازه قطعات تکثیر شونده را تعیین می‌کنند.

۳- Taq polymerase آنزیم مقاوم به دما است که عمل همانند سازی DNA را انجام می‌دهد.

۴- دزوکسی نوکلئوزید تری فسفاتها (dNTPs): به مانند مصالح ساختمانی که توسط DNA پلیمراز برای ساختن رشته های DNA جدید به کار می‌روند.

۵- محلول بافر: شرایط محیطی مناسبی را از نظر pH و یونهای مختلف ایجاد می‌کند تا پایداری DNA پلیمراز و فعالیت بهینه آن تأمین شود.

۶- کاتیونهای دو ظرفیتی: یونهای منیزیم

۳-۷-۱ آلودگی PCR و راه حل آن

یکی از مشکلاتی که ممکن است در PCR به وجود بیاید، آلودگی نمونه‌های مورد بررسی توسط قطعات DNA خارجی است. اگر قبلاً در داخل دستگاهی PCR یک نمونه انجام گرفته باشد و ذره کوچکی از آن در داخل دستگاه باقی بماند در PCR نمونه بعدی مشکل ایجاد خواهد کرد. به دلیل حساسیت فوق العاده و قدرت تکثیر زیاد PCR، هر قطعه DNA خارجی که وارد محیط PCR شود، مورد تکثیر قرار گرفته و نتایج عجیب و دور از واقعیتی به وجود خواهد آورد. برای رفع مشکل امروزه از ظروف یکبار مصرف استفاده می‌شود. کلیه ظروف قبل از استفاده اتوکلاو می‌شوند تا سلول‌ها و مولکول های موجود در آنها، حتی‌الامکان غیر فعال شوند.

یکی از روش‌های پیشنهادی انجام PCR داخلی یا Nested PCR است. در این روش با استفاده از دو پرایمر قطعه‌ای از DNA را تکثیر می‌دهند و سپس قطعه‌ای دیگر در داخل DNA های تکثیر شده PCR می‌شود. بدین صورت احتمال آلودگی کاهش می‌یابد ولی با تمامی نکات گفته شده فوق برای جلوگیری از اشتباهات احتمالی در PCR همواره باید شاهدهای مثبت و منفی در هر سری از آزمایش ها وجود داشته باشند.

۴-۷-۱- توالی‌یابی

یکی از مهم ترین فناوری های در دسترس زیست شناسان مولکولی توالی‌یابی DNA است که در تحقیقات مولکولی، برای تعیین ترتیب دقیق بازها در مورد DNA یا اسیدهای آمینه پروتئین استفاده می شود. اطلاعات به دست آمده می‌تواند در تعیین و شناسایی عملکرد نمونه DNA یا پروتئین جداسازی شده کمک نماید. توالی‌یابی اخیراً به عنوان تکنیکی از دانش بیولوژی مولکولی در آمده که سریعاً در حال پیشرفت است به طوری که اخیراً در بیشتر آزمایشگاه ها بر اساس اطلاعات حاصل از آن نشانه گذاری رادیواکتیو، الکتروفورز نمونه ها بر ژل‌های پلی اکریل آمید و سپس تجزیه و تحلیل اتو رادیوگراف ها انجام می‌شود (قرایی و غفاری، ۱۳۹۰). بر اساس اصول توالی‌یابی DNA دو روش عمده توالی‌یابی تقریباً به طور هم زمان ابداع شده اند که از اصلی ترین روش های توالی یابی می باشند. روش خاتمه زنجیره توسط فرد سانگر[1] و همکاران (Sanger et al.1975) در بریتانیا و روش تجزیه شیمیایی توسط ماکسام و گیلبرت[2] (Maxam and Gilbert 1997) در ایالات متحده آمریکا ابداع گردید .

۵-۷-۱ -آغازگرها و نحوه طراحی آنها

آنزیم‌های پلی مراز جهت ساخت یک پلی نوکلئوتید به بخشهای دو رشته‌ای دارند که بتوانند با الگو گیری از رشته طویلتر از قسمت ´3-´5 قطعه کوچکتر را کامل نمایند. این قطعه کوچکتر که دارای دو انتهای ´5 و ´3 که از طرف ´5 بسته شده است و توان اتصالی به نوکلئوتید مجاور را از دست داده است آغازگر نامیده می شود. طراحی صحیح و استفاده مناسب با غلظتهای حساب شده از این آغازگر می‌تواند زمینه موفقیت در دست یابی به محصول PCR را افزایش دهد. بصورتیکه اگر آغازگرها بطور صحیحی طراحی شوند، آزمایش منجر به تکثیر یک قطعه منفرد DNA، معادل با ناحیه هدف در مولکول الگو خواهد شد. در صورتیکه اگر آغازگرها بطور نامناسب طراحی شوند آزمایش منتج به نتیجه مطلوب نخواهد شد.

جهت طراحی پرایمر ها نیازی به آگاهی از توالی قسمت مورد نظر در رشته الگو بوده و آغازگرها طوری طراحی می شوند که با رشته الگوی خودشان مکمل باشند تا دو رگ سازی بطور صحیح انجام شود.

همچنین بایستی توجه داشت قسمتهای ابتدایی هر پرایمر (´5) بایستی فاقد خاصیت و قدرت اتصال در طراحی بوده و قسمتهای ´3 در آغازگر به سمت همدیگر انتخاب شوند. مطلوبترین نتایج زمانی بدست می آید که قطعه مورد نظر کمتر از یک کیلو باز باشد زیرا هر چه قطعات بزرگتر باشند کارایی کمتری در تکثیر دارند و اشکالات بیشتری در بدست آوردن نتایج مناسب وجود خواهد داشت.

---

[1] Sanger
[2] Maxam and Gilbert

آغازگرهایی که در حدود (۲۰-۱۸) نوکلئوتید می باشند جهت انجام واکنش مناسبتر از انواعی با تعداد نوکلئوتید پایین‌تر می باشند زیرا در آغازگرها با طول کوتاه امکان اتصال با ناحیه غیر هدف زیادتر بوده و امکان تولید فراورده‌های نامطلوب بیشتر خواهد بود.

همچنین در آغازگرهای با طول بیشتر امکان برقراری اتصالات کمتر و با نسبت کندتری اتصالات برقرار می‌شود.تا حد ممکن در طراحی آغازگرها بایستی دقت شود تا آغازگرها تعداد مساوی از هر چهار باز را داشته باشند و همچنین جهت برقراری اتصالات قوی تر حداقل به میزان ۵۰٪ شامل نوکلئوتیدهای سیتوزین و گوانین باشند. همچنین تا حد امکان بایستی سعی شود تا از انتخاب آغازگرهایی که انتهای ´3 آنها دارای نوکلئوتیدهای مکمل باشد خودداری شود و نیز به منظور عدم وجود اتصالات بین پرایمر ها و دورگ شدن آنها بایستی سعی شود درصد دایمر شدن پرایمرها نیز به حداقل رسانده شود.

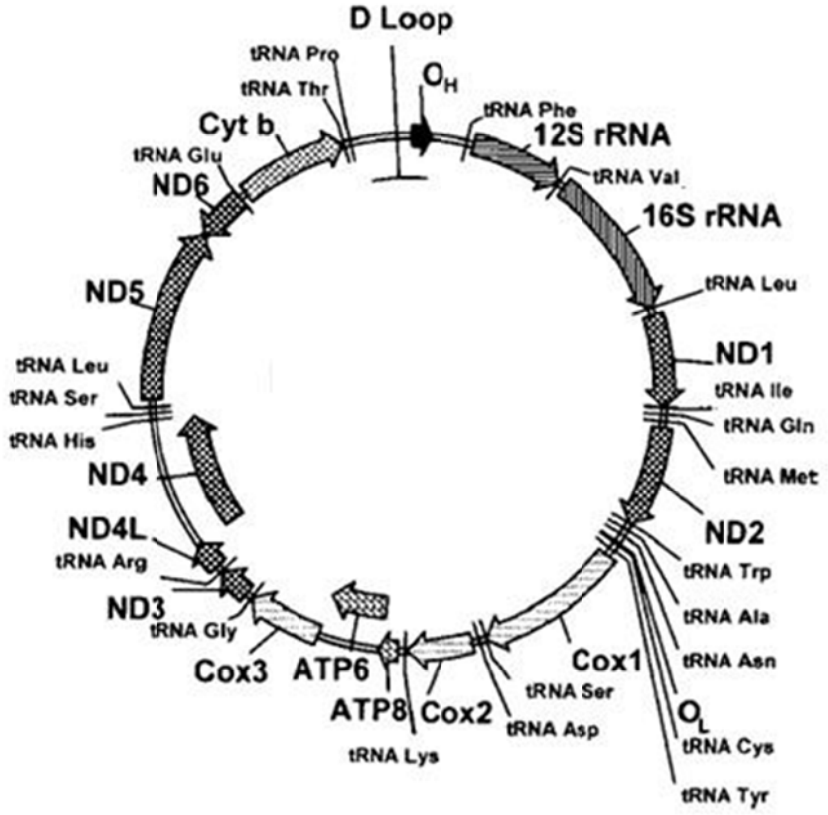
۶-۷-۱ -mtDNA ژنوم میتوکندریایی و کاربرد آن

بررسی‌های mtDNA کاربردهایی را در زیست شناسی و مدیریت صید و ارتباط فایلوژتی و تهیه بانک ژن دارد که از جمله می توان به بررسی تغییرات درون و بین جمعیتی افراد در سطح گونه و جنس و همچنین مطالعات تاکسونومی و رده بندی اشاره نمود. مطالعات mtDNA می‌تواند در شناسایی ذخایر ماهیان نیز به کار رود و همچنین اطلاعاتی را برای بررسی دو رگه‌گیری و هم‌آمیزی ژنتیکی ماهیان فراهم آورده و به عنوان نشانگر ژنتیکی در حفاظت و احیای گونه‌های ماهیان مورد استفاده قرار گیرد. در برنامه های بازسازی ذخایر نیز که بر برنامه‌های رهاسازی استوارند، تنوع mtDNA برای ارزیابی بقا و رشد ماهیان رها سازی شده استفاده می شود و به کمک آن می توان ماهیان ساکن و ماهیان رهاسازی شده را تفکیک و شناسایی نمود (Billington and Hebert 1991). متداول‌ترین نشانگرهای مولکولی که در سطح mtDNA استفاده می شوند شامل 16SrRNA، 12SrRNA، COI، ژن سیتوکروم b و ناحیه کنترلی (D-Loop) هستند. مطالعات نشان می‌دهد که ناحیه 16SrRNA دارای یک سرعت پایین تکاملی است بدین معنی که برای تفاوت‌های بین گونه‌ای بیشتر از درون گونه‌ای مفید است 16SrRNA برای بررسی روابط فیلوژنتیک ماهیان در ژن سطوح مختلف طبقه بندی استفاده شده است که عمدتاً به این دلیل است که این ژن بسیار حفاظت شده بوده و یک تکامل تدریجی و آهسته دارد. از دیگر علل انتخاب این ژن بالا بودن تعداد کپی این مولکول و پایداری آن در سلول است (Page and Holmes1998). امروزه کاربرد توالی یابی mtDNA در بررسی روابط شجره شناسی ماهیان از زمینه‌های تحقیقاتی مهم محسوب می‌شود. نوع توالی مورد استفاده به سطح شجره شناسی فرضیه مورد آزمون بستگی دارد، توالی های با سرعت تکامل متوسط (مانند سیتوکروم b) برای بررسی روابط بین جنس ها استفاده می شوند و برای

مقایسه در سطح خانواده‌ها، ژن‌های دارای سرعت تکامل کند مانند ژن‌های 12S و RNA 16S ریبوزومی و COI را می-توان استفاده نمود (Stepien and Kocher 1997).

عموما mtDNA ماهیان هوموپلاسمیک است به این مفهوم که تمامی مولکول‌های یک موجود با هم مشابه می‌باشند و از این رو می‌توان هر بافتی را به عنوان منبع DNA در تهیه بانک ژن به کار برد. mtDNA هر سلول در چند نسخه وجود دارد و بنابراین جداسازی و تخلیص آن نسبتاً آسان است (برون، ۱۹۸۳). سه ویژگی mtDNA جانوری آن را به نشانگر ژنتیکی کارامدی برای بررسی های سیستماتیک مولکولی، ژنتیک جمعیت و بررسی روابط شجره‌ای گونه-های خویشاوندِ نزدیک، مبدل کرده است. این ویژگی ها عبارتند از تعداد زیاد نسخه به ازای هر سلول (تقریباً ۱۰۰۰ نسخه و بیشتر)، اندازه کوچکتر آن از DNA ژنومی، وراثت پذیری مادری، هاپلوئید بودن و عدم وجود نوترکیبی در آن. همچنین از امتیاز دیگر DNA میتوکندریایی این است که سرعت جایگزینی نوکلئوتیدها در mtDNA مهره داران عالی تقریباً ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از ژنوم هسته است. بنابراین mtDNA شامل تنوع بیشتری در توالی بازهای آلی است که در نتیجه تشخیص گونه‌های کاملاً وابسته را امکان پذیر می‌کند (Naderi et al.2007).

ژنوم میتوکندریایی یا mtDNA به طور گسترده ای در بررسی جمعیت های گونه های مختلف آبزیان مورد استفاده قرار می گیرد و کارایی خوبی در بررسی تنوع ژنتیکی و جداسازی جمعیت ها دارد. ژنوم میتوکندری از طریق مادری به ارث میرسد و بنابراین پدیده کراسینگ اور و نوترکیبی در آن صورت نمی گیرد. این خاصیت باعث بروز اختلاف ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته شده است و از این رو برای تشخیص گروه هایی از موجودات که برای سالها از هم جدا بوده اند نشانگر خوبی می باشد (Berrebi). ژن 16sRNA یکی از نواحی بسیار متغیر در ژنوم میتوکندریایی می باشند که می توان با استفاده از تکنیک توالی یابی این ناحیه تنوع ژنتیکی را بررسی نمود.



شکل ۷ : نحوه قرار گرفتن ژنها در DNA میتوکندری (Alexeyev et al., 2004).

توالی یابی ژنوم میتو کندریایی (mtDNA sequencing) یکی از پرکاربردترین روشها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی (شجره شناسی ژنتیکی) و فیلوژئوگرافی (شجره شناسی جغرافیایی) بین جمعیت ها و گونه های نزدیک به هم محسوب می شود (Bruford et al.2003). توالی یابی میتوکندریایی با مقایسه نوکلئوتیدها و مشخص شدن اختلاف بین توالی های مختلف تعیین می گردد. ژنوم میتو کندری هر گونه از بی مهرگان که تا به امروز مورد بررسی قرار گرفته است با گونه دیگر متفاوت بوده است. همه این تنوع ها منعکس کننده تکامل میتوکندری در موجودات بوده و می توان نحوه تکامل موجودات را با استفاده از توالی یابی ژنوم میتوکندری آنها بررسی نمود (Tjensvoll 2008). روشن است که در بسیاری از گونه های ماهیان mtDNA دارای تغییرات قابل ملاحظه ای بوده و این تغییرات را می توان مبنای تفکیک ذخایر قرار داد (Brown 2008).

۸-۱ - بانک ژن

مشهورترین پایگاه داده های توالی نوکلئوتیدی و مستندات مربوط است که به عنوان بخشی از کتابخانه ملی پزشکی (Library of Medicine National) در سال۱۹۸۲ پایه گذاری شد.

به دلیل تسلیم انواع داده‌های ژنومی، رشد اطلاعات در این بانک بسیار سریع است به طور میانگین، ماهانه ۳ میلیون توالی و ۱۴۰۰ گونه جدید به این بانک اطلاعاتی افزوده می‌گردد به طوری که تقریبا هر ۱۰ ماه حجم اطلاعات آن دوبرابر می‌شود.

اکنون تعداد ۱۰۶۵۳۳۱۵۶۷۵۶زوج نوکلئوتید در قالب ۱۰۸۴۳۱۶۹۲ پیشینه توالی در بخش سنتی بانک ژن و تعداد ۱۴۸۱۵۶۱۱۷۷۶۳ زوج در قالب ۴۸۴۳۳۰۶۷ پیشینه توالی در بخش WGS این بانک اطلاعاتی وجود دارد.بانک ژن بخشی از پروژه همکاری بین المللی در زمینه توالی های نوکلئوتیدی(INSDC) است.این پروژه بین المللی شامل بانک ژن(GB) و بانک اطلاعاتی دی ان ای ژاپن(DDBJ) و آزمایشگاه بیولوژی ملکولی اروپا(EMBL) است .این بانک های سه گانه بطور روزانه داده ای خود را مبادله می کنند.

داده های موجود در GenBank و بانک های مشابه از دو طریق تامین می شود:

از تحقیقات پژوهشگران در دنیا و از مراکز توالی یابی ژنوم‌ها در دنیا به شکل های مختلف .

هدف از این تحقیق عبارت است از:

۱- استخراج DNA با غلظت بسیار بالا (۱۰۰ نانوگرم در ماکرولیتر) از ۵ گونه میگوی اقتصادی خلیج فارس و دریای عمان (*P. semisulcatus* ، *P. indicus* ، *P. merguiensis* ، *P. monodon* ، *M. affinis*) به روش فنل کلروفرم و نگهداری در فریزر منهای ۸۶ با استفاده از نگهدارنده TE و همچنین ازت مایع برای مدت زمان طولانی.

۲ – تعیین توالی و بررسی فایلوژنی گونه های مورد مطالعه با استفاده از دو ژن

ناحیه ژنی که برای شناسایی مورد استفاده قرار می گیرد ناحیه ژن سیتو کروم اکسیداز (Co1) و 16S میتوکندری می باشد که در سالهای گذشته در شناسایی ماهیان ، پرندگان، پروانه ها، ، حشرات ، انگلها و پارازیتها بسیار موثر بوده است.

۳- آنالیز داده ها و مقایسه توالی ها با توالی های موجود در بانک ژن از طریق هم ردیف کردن و رسم درخت فایلوژنی آنها .

این مطالعه با نمونه برداری آغاز وبعد از استخراج DNA و تهیه بانک ژن ، با استفاده از یک جفت پرایمر طراحی شده از ژن سیتو کروم اکسیداز (Co1) محصول PCR بدست امده و محصول PCR بعد از خالص سازی جهت Sequencing یا تعیین توالی انجام شده و و توالی ها در بانک جهانی ژن ثبت میگردد. نمونه های بافت از عضله و پای شنای ۵ گونه میگوی اقتصادی خلیج فارس و دریای عمان تهیه و در ازت مایع و فریزر منهای ۸۶ نگهداری میگردد .

۲- مروری بر منابع

۲-۱ - مطالعات و تحقیق در ایران

بانک ژن برای نخستین بار در ایران از حدود ۴۰ سال قبل فعالیت خود را جهت حفظ ذخایر توارثی کشور (عمدتاً مرتعی) آغاز نمود و تا سال ۱۳۷۷ به عنوان زیر مجموعه بخشهای تحقیقاتی مرتع و ژنتیک و فیزیولوژی فعالیت داشت. با توجه به اهمیت موضوع حفاظت ذخایر خدادادی ملی و وظیفه ای که در این خصوص بر عهده داشت، مسئولان بیش از پیش به نقش بانک ژن واقف و همّ خود را در توسعه و تقویت آن به کار گرفتند.

کشاورزی (۱۳۹۲) تنوع ژنتیکی میگوی موزی *penaeus merguiensis* را در خوریات لافت و سیریک با استفاده از توالی یابی ژن 16SrRNA میتوکندریایی مورد بررسی قرار داد. تنوع هاپلوتیپی درون جمعیتی و بین جمعیتی بالایی در بین جمعیت های این گونه در دو منطقه مورد بررسی گزارش شد. همچنین نتایج نشان داد که جمعیت های میگوی موزی در خوریات لافت و سیریک جمعیت های واحدی را از نظر ژنتیکی تشکیل می دهند هر چند به یقین یکی بودن جمعیت های دو منطقه قابل استنتاج نبود.

وحیدی نژاد (۱۳۹۲) تنوع ژنتیکی سخت پوست *Paramysis intermedia* از خانواده مایسیده را در برخی استخرهای پرورش میگوی استانهای هرمزگان و سیستان و بلوچستان با استفاده از توالی یابی ژن 16SrRNA میتوکندریایی بررسی نمود. تنوع هاپلوتیپی درون جمعیتی و بین جمعیتی بالایی در بین جمعیت های پارامایسیس در دو منطقه تیاب و خلیج گواتر در خلیج فارس و دریای عمان گزارش گردید. میزان تنوع نوکلئوتیدی درون و بین جمعیتی پارامایسیس در منطقه تیاب در خلیج فارس بیشتر از منطقه خلیج گواتر در دریای عمان بود. همچنین نتایج نشان داد که جمعیت های پارامایسیس منطقه تیاب و خلیج گواتر احتمالاً جمعیت های مجزایی را از نظر ژنتیکی تشکیل می دهند.

تمدنی (۱۳۹۰) ساختار ژنتیک دو گونه از میگوهای جنس پنائوس(Penaeus) شامل میگوی موزی (P. merguiensis) و میگوی سفید هندی (P. indicus) با استفاده از ۸ جفت اغازگر میکرو ستلایت (ریز ماهواره) مورد بررسی قرار دادند. با توجه به مقادیر Fst بین نمونه های ثبت شده مربوط به میگوی موزی مشخص گردیدکه مناطق هرمز و گواتر از تمایز ژنتیکی متوسط با جریان ژنی کمتری نسبت به دو منطقه هرمز و جاسک برخوردارند

همچنین تاسیس "بانک ژن ماهیان خاویاری کشور" با اعتبار ۸۵۰۰ میلیون ریالی از سوی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور در محل موسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری کشور(استان گیلان- رشت، جوار سد سنگر) انجام شد که در خرداد ماه ۱۳۹۱ رسما افتتاح و آغاز بکار نمود. پروژه پایلوت و کاربردی دیگری توسط پورکاظمی ۱۳۹۱ با عنوان " تشکیل خزانه ژنی ماهیان خاویاری نژاد سفید رود" و با حمایت مالی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور و برنامه محیط زیست دریای خزر- Caspeco-CEP اجرا گردید که با موفقیت توانست ضمن جمع آوری تعداد معدودی مولد تاسماهی ایرانی و ازون برون و تکثیر به روش زنده میکروسزارین تعداد ۲۳۰۰۰

عدد بچه ماهی پلاک گذاری شده را با وزن بالای ۲۰ گرم به دریای خزر رها سازی نماید. علاوه بر آن موفق به انجماد اسپرم و ذخیره سازی آن در مخازن ازت مایع نماید. بانک بافت و DNA دو گونه ماهیان خاویاری را تشکیل دهد. ولی متاسفانه تا کنون موفق به جمع آوری مولد از ۳ گونه دیگر خاویاری (فیل ماهی، تاسماهی روسی و تاسماهی شیپ) نشد. همچنین مولد سازی با استفاده ار بچه ماهیان تولید شده از طریق تکثیر مصنوعی بود که حدود ۱۰۰۰ عدد از آن در حال پرورش می باشد تا در صورت نابودی احتمالی ماهیان در محیط زیست طبیعی خود (دریای خزر) بتوان از این ماهیان جهت احیاء ذخایر استفاده نمود و یا در صورت توسعه آبزی پروری از نژاد فوق جهت پرورش و تولید گوشت و خاویار استفاده گردد تا ذخایر ژنتیکی آن بطور کامل منقرض نشود.

. مهم ترین فعالیت ها و مزایای مرتبط با بانک ژنوم شناسایی تمامی گونه های جانوری موجود در هر کشور و گونه های جانوری هر منطقه ، استان و شهرستان و میزان تراکم نسبی آن ها ، معرفی ویژگی های فیزیولوژیکی ، ژنتیکی و محیطی رفتاری هر گونه ، انجام مطالعات کاربردی برای تعیین شباهت های ژنتیکی ، تولید مثلی و انجام مطالعات اولیه برای ایجاد بانک ژنوم گامت (تخمک و اسپرم) در جهت بهبود پتانسیل تکثیر طبیعی یا آزمایشگاهی این جانوران است . در واقع ساخت بانک ژنوم سنگ بنای خیری است که می تواند نه تنها گونه های ارزشمند ایرانی را در کف حمایت خود قرار دهد، بلکه دایره المعارف جامع و ارزشمندی است که به آیندگان تقدیم می شود .

در همین ارتباط تعداد بانک‌های ژن موازی با فعالیت بانک ژن اصلی که در ستاد مرکزی سازمان حفاظت محیط زیست در تهران راه اندازی شده است و تا پایان برنامه پنج ساله پنجم به هشت بانک خواهد رسید.

با توجه به مخاطرات موجود در زمینه انقراض گونه های جانوری و گیاهی اقدام به راه اندازی این بانک در کشور شده است. این بانک در حوزه های پستانداران، خزندگان، پرنده، گیاهان در معرض خطر و آبزیان در معرض تهدید فعال است.

گونه های جمع آوری شده

در حال حاضر بالغ بر ۵۰۰ نمونه از پستانداران در این بانک موجود است و به تدریج آمار این نمونه ها در حال افزایش است. بالغ بر ۱۵۰ نمونه از پرندگان به ویژه پرندگانی که نیاز به مدیریت جمعیتی دارند مانند "هوبره" و برخی از پرندگان شکاری در بانک جمع آوری شده اند. ضمن آنکه ژنوم بالغ بر ۷۰۰ نمونه خزندگان، حدود ۱۵ نمونه از ماهیان و ۱۷ نمونه از دوزیستان را در اختیار داریم.بانک ژنوم حشرات نیز راه اندازی شده است ضمن آنکه نزدیک به ۱۰۰ نمونه توده بذری بانکینگ شده است.

این بانک شامل گیاهان در معرض خطر انقراض است.در کنار این اقدامات، آنالیز ژنی بر روی نمونه های موجود در حوزه بی مهرگان در حال انجام است.

بدون شک گام نخست در ایجاد بانک ژن یک گونه، شناخت جمعیت ها و نژادهای آن گونه در اکوسیستم آبی و حوزه پراکنش آن می باشد. در این راستا مطالعات متعددی در خصوص جمعیت های انواع آبزیان انجام شده است.
اولین مطالعه درخصوص بررسی ساختار ژنتیک جمعیت ماهی ازون برون، تاسماهی روسی در حوزه آبهای ایرانی دریای خزر بود که توسط Pourkazemi 1996 انجام شد و همچنین برای گونه های فیلماهی ، تاسماهی ایرانی و روسی توسط Rezvani 1997 صورت پذیرفت. دیگر مطالعات مرتبط می توان به شعبانی (۱۳۸۴)بر روی گونه ازون برون خزر شمالی و جنوبی خزر به روش PCR-RFLP و همچنین نوروزی (۱۳۸۶) بر روی ساختار ژنتیکی ماهی ازون برون به روش میکروستلایت ، خوش خلق (۱۳۸۵) بر روی تاسماهی ایرانی و روسی به روش میکروستلایت، قاسمی (۱۳۸۲) و صفری (۱۳۸۵) بر روی ساختار ژنتیک جمعیت تاسماهی شیب به ترتیب با روشPCR-RFLP و میکروستلایت و همچنین پورکاظمی (۱۳۸۵) اشاره نمود.که همه مطالعات مبین وجود جمعیت های متمایز از گونه های مختلف مورد بررسی بود.
بررسی طرح تهیه بانک ژنوم گونه های غالب پوشش گیاهی استان و دو نوع علفخوار(قوچ و میش) در ۳ منطقه کلاه قاضی – موته و قمیشلو از طریق سازمان حفاظت محیط زیست اصفهان و به موازات سازمان محیط زیست کل کشور از ابتدای سال ۸۴ آغاز شد و اواخر سال گذشته به پایان رسید .
همچنین پورکاظمی (۱۳۸۷) طرح جامع ساختار ژنتیکی تاسماهیان دریای خزررا انجام دادند. که در آن تعداد ۱۱۲۱ عدد نمونه مورد بررسی قرار گرفت .
در همین ارتباط توسط ذریه زهرا (۱۳۹۱) برای تشکیل بانک ژن ماهی آزاد دریای خزر با حمایت مالی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور و برنامه محیط زیست دریای خزر– Caspeco-CEP انجام شد که ضمن جمع آوری تعدادی مولدین وحشی ماهی آزاد از چند رودخانه مهم دراستانهای گیلان و مازندران نسبت به تکثیر و رهاسازی بچه ماهیان به دریای خزر اقدام شد . بافت و DNA این مولدین جمع آوری ودر حال نگهداری است و بچه ماهیان جهت مولد سازی در حال پرورش میباشد. همانند ماهیان خاویاری مقداری از اسپرم آزاد ماهیان در ازت مایع منجمد و در بانک اسپرم در حال نگهداری است .
ساختار ژنتیک جمعیت ماهی سفید دریای خزر توسط عبدالحی (۱۳۸۹) مورد مطالعه قرار گرفت که از رودخانه های لمیر، حویق، سفید رود، شیرود و تجن نمونه بافت از مولدین بالغ جمع آوری و با دو روش PCR-RFLP و میکروستلایت انجام گردید. لالوئی و همگاران (۱۳۸۴). ساختار ژنتیک جمعیت ماهی Barbus caspito در آبهای حوضه جنوبی دریای خزر بروش pcr-rflp. مورد بررسی قرار دادند. خارا و همکاران (۱۳۸۴).ساختار مورفولوژیکی و ژنتیکی ماهی سیم (A. brama) در تالاب انزلی، سواحل جنوبی دریای خزر (ایران) و سواحل جنوب غربی دریای خزر (جمهوری آذربایجان) را مورد ارزیابی قرار دادند و جمعیت های متمایزی مشاهده نمودند.

رحمانی (۱۳۸۳) پویایی شناسی جمعیت و تنوع ژنتیکی ماهی شاه‌کولی Chalcalburnus chalcoides در رودخانه‌های هراز، شیرود و گزافرود مورد مطالع قرار دادند. ساختار ژنتیک جمعیت و فیلوژنی سوف حاج طرخان در تالابهای انزلی و امیرکلایه لاهیجان و سوف سفید در سد ارس و حوضه جنوبی دریای خزر توسط قریب خانی (۱۳۸۸) مورد بررسی قرار گرفت.ساختار مورفولوژی و ژنتیکی جمعیت گاوماهی خزری Neogobius caspius در حوضه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP توسط رزمجو (۱۳۸۸) مورد مطالعه قرار گرفت . در آبهای خلیج فارس و دریای عمان مطالعات ژنتیک مولکولی معدودی صورت گرفت از جمله بیوسیستماتیک سه جنس Carangoides، Caranx ، Parsatromateus از خانواده گیش ماهیان در آبهای خلیج فارس بروش ریخت‌سنجی و مولکولی (mtDNA) توسط ابدالی (۱۳۸۳)مورد بررسی قرار گرفت. ساختار مولکولی ژنتیک جمعیت سه گونه میگوی مهم خلیج فارس توسط بابایی در سال ۱۳۸۰ مورد بررسی قرار گرفت.

تیرانی و همکاران (۱۳۹۱) به بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌هایی از ماهی سرخو در خلیج فارس و دریای عمان با توالی‌یابی ژن 12SrRNA پرداختند. نتایج بدست آمده نشان داد که تعداد هاپلوتیپ‌های موجود در منطقه هرمزگان و چابهار چهار هاپلوتیپ و در منطقه بوشهر دو هاپلوتیپ می‌باشد. بیشترین تنوع هاپلوتیپی در درون جمعیت‌ها در آبهای چابهار و هرمزگان و کمترین تنوع هاپلوتیپی در بوشهر مشاهده شد. در این مطالعه مشخص گردید که دو جمعیت هرمزگان و چابهار در یک شاخه یا جد و نیای مشترک قرار می‌گیرند و جمعیت ماهی سرخو در منطقه بوشهر در یک شاخه جداگانه خود را نشان می دهد.

ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی راشگو معمولی *Eleutheronema tetradactylum* در خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از روش تعیین توالی با استفاده از ژن 28SrRNA مورد بررسی قرار گرفت (خالدی و همکاران، ۱۳۹۱). نتایج بررسی ۴۱ نمونه که از چهار منطقه خوزستان، بوشهر، بندرعباس و سیستان و بلوچستان جمع آوری شده بودند، بیشترین تعداد و تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی را در جمعیت بندرعباس و کمترین مقدار شاخص های مذکور را در جمعیت بوشهر نشان داد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت بوشهر و بندرعباس و کمترین بین بوشهر و چابهار ثبت گردید. واگرایی جمعیتی بین جمعیت های خوزستان و چابهار بیشترین و بین جمعیت های بوشهر و چابهار کمترین مقدار بود.

رهنما و همکاران (۱۳۸۸) به مقایسه مولکولی اولیه میگوی ببری سبز *Penaeus semisulcatus* خلیج فارس و زیرگونه - آن *Penaeus semisulcatus persicus* با استفاده از 16SrRNA میتوکندریایی پرداختند. نتایج حاصل از تعیین توالی نشان داد که قطعه تکثیر شده دقیقا دارای ۵۶۱ جفت باز است. همردیفی توالی های گونه 16SrRNA و زیر گونه آن از هر دو ناحیه بوشهر و بندرعباس نشان داد که توالی‌های 16SrRNA از هر دو ناحیه بوشهر و بندرعباس دقیقا با هم مطابقت

دارند. نتیجه همردیفی توالی توافقی از گونه و زیرگونه مذکور نشان داد که ۱۸ جانشینی بازی در این دو رخ داده و نسبت جانشینی ترانزیشن به ترانسورژن ۳/۰۹۶ محاسبه شد.

۲-۲ مطالعه و تحقیق در خارج از کشور

در ویتنام بین سالهای ۱۹۹۶ تا۲۰۰۰ اقدام به تهیه بانک ژن از منابع دریایی به منظور حفظ و تولید پایدار از این منابع در آینده نمود . بدین منظور این پروژه در ۳ قسمت انجام کاریوتایپ و کرد آوری اطلاعات مورفولوژیکی ، نگهداری بافت در ازت مایع و همچنین نگهداری موجود زنده در استخر انجام گردید. .

از سال ۱۳۸۶ برای راه اندازی زیست بانک اقدام شد. فعالیت و مطالعات توسط گروههای تخصصی در چهار حوزه گیاهی، میکروارگانیسم ها، انسانی و جانوری، مولکولی از همان ابتدا آغاز شد که نهایتا در سال ۱۳۸۷ به اتمام رسید. در نهایت مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران در سال ۱۳۸۸ در کشور افتتاح شد. و اکنون درحوزه های گیاهی، میکروارگانیسم ها، انسانی و جانوری، مولکولی، نزدیک به ۱۹ هزار نمونه ژنتیکی با۲۷ کلکسیون در این مرکز ذخیره و به ثبت رسیده است

شوستر با اشاره به «فهرست قرمز» گونه‌های به شدت در خطر انقراض که توسط انجمن بین‌المللی حفاظت از طبیعت، IUCNتهیه شده، پیشنهاد می‌کند که پژوهشگران برای تهیه توالی ژنی حیوانات این فهرست و هم‌چنین گونه‌های منقرض شده برنامه‌ریزی کنند، و «فهرستی از گونه‌های به دقت انتخاب شده جانوران در خطر انقراض و گونه‌های منقرض شده» را برای این کار تهیه کنند.

به گفته شوستر، اطلاعات مولکولی علاوه بر این می‌توانند به عنوان معیاری از در معرض خطر انقراض بودن نیز عمل کنند. او می‌گوید: «هنگامی که مشخص‌تر شود وقتی یک گونه به انقراض نزدیک می‌شود، بر سر تنوع ژنتیکی آن چه می‌آید؛ آنگاه شما می‌توانید این اطلاعات زیر بنایی را به اولیای امور و کسانی که تصمیمات سیاسی را اتخاذ می‌کنند، ارائه کنید و بگویید این روند باید کاملا متوقف شود.

دوین لاک از مرکز ژنوم دانشگاه واشنگتن، هنگامی که به شرکت‌کنندگان در کارگاه گفت که در پایان سال جاری، او و همکارانش انتظار دارند اطلاعات ژنوم را با سرعتی ۵۰۰ برابر آن‌چه در سال ۲۰۰۶ داشتند تهیه کنند، نشان داد که توانایی بالقوه فناوری‌های جدید چقدر زیاد است

برای سایر گونه های خاویاری در خارج از کشور مطالعات متعددی بر روی ساختار ژنتیک جمعیت گونه ها انجام گرفت که برحسب حوزه جغرافیایی مورد بررسی از جمعیت های متمایزی تشکیل یافته است شامل May et al (1997) با استفاده از روش مایکروستلایت بر روی گونه تاسماهی دریاچه ای McQuown et al. (2003) بر روی تاسماهی دریاچه ای (A. fulvensis)، در مطالعه دیگری توسط Ludwig et al. (2002) بر روی تاسماهی A. oxyrinchus که اثبات

نمود این گونه ابتدا در قاره اروپا بوده ولی بتدریج منقرض شد و به پیشنهاد وی تعدادی از مولدین از آمریکای شمالی (کانادا) جهت پیوند به آبهای اروپا به طور زنده به کشور آلمان انتقال داده شد.

Zhu Bin و همکاران (۲۰۰۶) مطالعه ای در خصوص ساختار ژنتیک جمعیت تاسماهی چین انجام دادند و اثبات نمودند که این گونه از جمعیت های مختلفی تشکیل شده است.

در هر حال لازمه و گام نخست تشکیل بانک ژن زنده آبزیان آگاهی و شناخت کامل از وضعیت ساختار ژنتیکی و تعداد جمعیت های آن است تا بتوان بر اساس مارکرهای ژنتیکی هریک از جمعیت ها را شناسایی و برای آن خزانه ژنی مجزا و تفکیک شده ای تشکیل داد در غیراینصورت تشکیل خزانه ژنی از ماهیان متعدد بی هویت ژنتیکی ایجاد خواهد گردید.

وانا[1] و همکاران (۲۰۰۴) از نشانگرهای DNA هسته ای برای بررسی تنوع ژنتیکی و تفاوت بین جمعیتی میگوی موزی در خلیج تایلند و دریای آندامان استفاده نمودند. ۱۶۳ نمونه جمع آوری شده از پنج جمعیت در خلیج تایلند و دریای آندامان مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان دهنده تمایز بین جمعیتی زیاد نمونه های خلیج تایلند و دریای آندامان بوده و علاوه بر این تمایز قابل توجهی نیز در داخل نمونه های جمعیت خلیج تایلند مشاهده شد.

لی[2] و همکاران (Li et al.2009) به بررسی تنوع ژنتیکی میگوی چینی *Fenneropenaeus chinensis* در دریای زرد و دریای Bohai با استفاده از توالی یابی ژن COI پرداختند. ۹۱ نمونه از پنج منطقه در دریای زرد و دریای Bohai جمع آوری شد که پس از آنالیز نتایج، تعداد ۲۰ هاپلوتیپ مشخص گردید. دامنه تنوع هاپلوتیپی و دامنه تنوع نوکلئوتیدی به ترتیب ۰/۰۶۳۹-۰/۴۸۱۶ و ۰/۰۷۱۱-۰/۸۴۶۰ محاسبه شد. نتایج نشان داد که سطح تنوع ژنتیکی در این مناطق پایین است. بر اساس تجزیه واریانس ملکولی هیچ ساختار ژنتیکی قابل توجهی در جمعیت میگوی چینی مشاهده نشد که احتمالاً ناشی از ناپایداری زیستگاه و تغییرات سطح دریا می باشد.

خامنامتونگ[3] و همکاران (Khamnamtong et al.2009) به بررسی تنوع ژنتیکی و تمایز جغرافیایی میگوی ببری سیاه در آبهای تایلند با استفاده از ژن COI پرداختند. دامنه تنوع هاپلوتیپی ۰/۷۱۶- ۰/۹۲۷ محاسبه شد و با رسم درخت فیلوژنی تفکیک جغرافیایی مناطق نمونه برداری به وضوح مشخص گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، تنوع ژنتیکی بالایی در جمعیت میگوی ببری سیاه در آبهای تایلند مشاهده شد. آنالیز واریانس مولکولی نشان داد میگوی ببری سیاه در تایلند هموزیگوت نبوده و دارای تفاوت ژنتیکی درون گونه ای است.

[1] Wanna
[2] Li
[3] Khamnamtong

Barcoding اولین بار در سال ۲۰۰۳ توسط هبرت و گروه تحقیقاتی اش از دانشگاه گولف وارد عرصه جامعه علمی گردید. هبرت در مقاله خود تحت عنوان شناسایی زیست شناختی با استفاده از شناساگر مولکولی DNA Barcoding (Biological identifications through DNA barcodes) سیستمی نوین را برای شناخت و شناسایی گونه ها با استفاده از بخش کوچکی از DNA به عنوان بخش استاندارد ژنوم تعریف می کند .

در ایران نبز تحقیقات در زمینه بارکدینک و ثبت در سخت پوستان توسط حاجی بابایی و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام گرفته است.همچنین تحقیقات در این زمیینه در ایران در منطقه پارک ملی خلیج نایبند (استان بوشهر) بر روی ۷۰ گونه موجود در آن منطقه توسط انجام گردیده است . (Asgharian et al., 2011).

با پیشرفت تکنیک های جدید ، مخصوصا تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ، مارکر های تهیه شده از ژن سیتو کروم اکسیداز (Co1) اطلاعات غیر قابل تصورو ارزشمندی را برای استفاده در جنبه های مختلف تکثیر و پرورش آبزیان در اختیار محققین قرار داد. این اطلاعات شامل شناسایی و تفکیک ژنتیکی ذخایر ، برنامه های به گزینی مولدین و اندازه گیری میزان تغییرات کروموزومی و ژنتیکی در زمینه های القاء پلی پلوییدی در مولدین بوده است (Ferguson, 1994) .

اولین رده ء سلولی از ماهیان در سال ۱۹۶۲ توسط Wolf & Quimby ایجاد گردید سپس در سالهای ۱۹۹۰، ۱۹۹۲ و ۱۹۹۴ بترتیب توسط Lannan , Fryer و Zhang & Yang تحقیقاتی در زمینه ایجاد رده های متنوّعی از ماهیان سردآبی و گرمابی صورت گرفت که عمدتاً برای تشخیص آلودگی های ویروسی، ریکتزیایی و همچنین مطالعاتی در زمینه های سم شناسی و عوامل ایجاد کننده سرطان و مسائل ژنتیکی در این خصوص صورت پذیرفت.

۳- مواد و روشها

۳-۱ : موارد مورد استفاده

۱- بافر های STE (Salt, Triss, EDTA)

۲- SDS(Sodium dodesyl sulfate)

۳- پروتئیناز با غلظت ۱۰mg/ml

۴- phenol (pH= 7.8-8.2)

۵- الکل اتیلیک ۹۶ درصد

۶- ایزوامیل الکل

۷- کلروفورم

۸- پودر آگارز

۹- اتیدیوم برومید (EtBr)

۱۰- بافر سنگین کننده (loading buffer)

۱۱- بافر TBE (۱۰×)

۱۲- Total DNA

۱۳-dNTP

۱۴-MgCl2

۱۵- بافر PCR

۱۶-Taq DNA Polymerase

۱۷-d H2O

۱۸-Primers

۱۹- مارکر 50bp

۲۰- مارکر DNA/Hind III

۲- ۳ : دستگاههای مورد استفاده

	نام دستگاه	شرکت تولید کننده
۱	ترمال سایکلر (Thermal ceyler) مدل TC 341	Eppendorf , Germany
۲	ترمومیکسر (Thermomixer) مدل 5436	Eppendorf , Germany
۳	سانتریفوژ (Centrifuge) مد ل5415D	Eppendorf , Germany
۴	سانتریفوژ (Centrifuge) مدل 7200 - D	Eppendorf , Germany
۵	ترازوی دیجیتال با دقتmg ۰/۱ OHAUS	Sartriuos , Germany
۶	شیکر لوله (Shaker) مدل SL68	Sartriuos , Germany
۷	شیکر(Orbital shaker) مدل $\frac{75}{OS-2040}$	Sartriuos , Germany
۸	اسپکتروفتومتر(Spectrophotometer) مدل C ≡ CIL	Eppendorf , Germany
۹	PH متر دیجیتالی مدل PH 523- WTW	Sartriuos , Germany
۱۰	الکتروفورزافقی مدل SH - 502, 503	Vilber – Lurmat, France
۱۱	EPS (Electrophoresis) مدل EPS	Vilber – Lurmat, France
۱۳	ژل داکیو متیشن(photo man gel documentation system) مدل UVIS-20	Vilber – Lurmat, France
۱۴	بن ماری	Memert Germany
۱۶	فریزر ۲۰ – درجه سانتی گراد.	Delongi, Italy
۱۷	تانک ازت مایع	
۱۸	فریزر منهای ۸۶	Labtech, Korea

۳-۳ - روشها

۱-۳-۳ : روش نمونه برداری

نمونه برداری از مناطق جاسک ، گواتر و هرمز که مهمترین زیستگاه های گونه های مورد مطالعه می‌باشد به روش ترال کف انجام گرفت. نمونه برداری به صورت تصادفی از مناطق هرمز با مشخصات جغرافیایی57º06'N و 56º 29'E ،جاسک با مشخصات جغرافیایی25 º33'N و57 º44'E و گواتر با مشخصات جغرافیایی 25°10'N , 61°35'E انجام گرفت. که در نهایت از هریک از سه منطقه مذکور ۲۰ نمونه جمع آوری شد. از هر نمونه ۲ گرم از عضلات پشتی و پای شنا برداشته و در الکل اتیلیک خالص نگهداری و جهت انجام آزمایشات به آزمایشگاه منتقل شدند. همچنین از هر گونه به میزان ۲ گرم از عضله بصورت وکیوم شده در ازت مایع نگهداری شدند.

شکل۸ : مناطق نمونه برداری

۲-۳-۳ : استخراج ژنوم کل (Total DNA)

برای استخراج DNA روشهای مختلفی وجود دارد که در این تحقیق از دو روش استفاده شد.

۱-۲-۳-۳ - روش استخراج Total DNA با استفاده از فنل – کلروفورم (Taggart et al.,1990)

در این روش ابتدا mg ۵۰ از بافت عضلانی فیکس شده در اتانول خالص را در داخل تیوپهای ۱/۵ میلی لیتری بصورت قرارداده وخرد گردید . سپس بر روی آن مقدار۵۰۰ میکرولیتر از محلول STE (Salt,Triss,EDTA) ریخته شد. (طرز آماده سازی بافرها در ضمیمه آورده شده است). بدینصورت قطعات خرد شده بصورت سوسپانسیون در می‌آیند. در مرحله بعدی مقدار ۶ میکرولیتر پروتئنیاز K (10 mg/ml) و ۲۰ میکرولیتر SDS ۲۰٪ (سدیم دودسیل سولفات) به تیوبها اضافه کرده و تیوپها در ترمومیکسر ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵-۶ ساعت قرار داده شدند..بعد

از مرحله هضم سلولی مقدار ۴۲۵ ماکرولیتر فنل (PH= 8) ۴۲۵ ماکرولیتر کلروفرم – ایزو آمیل الکل (۲۴ :۱) اضافه نموده و به مدت ۱ دقیقه با استفاده از شیکلر هم زده شدند. سپس نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیدند. بعد از سانتریفوژ دو فاز در داخل تیوبها تشکیل گردیدکه فاز آبی یا محلول رویی را برداشته و فاز آلی را دور ریخته شدند فاز آبی را به تیوپهای جدید انتقال و مرحله اول دوباره تکرارشد. عمل مخلوط کردن توسط شیکر و سانتریفوژ مجدداً تکرار گردید. فاز رویی را به تیوبهای جدید منتقل و به مقدار هم حجم آن کلروفورم - ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه کرده و عمل هم زدن و سانتریفوژ کردن انجام گرفت. در نهایت دو برابر حجم محلول بالایی جدا شده، اتانول خالص و ۵۰ ماکرولیتر نمک ۴ مولار اضافه شد و بعد از چندین بار به هم زدن به مدت یک شبانه روز در فریزر ۲۰- قرار داده شد. روز بعد نمونه ها در دور ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریوفوژ گردید و فاز رویی دور ریخته و پلاک DNA در ته تیوب قابل مشاهده است. در مرحله بعد این پلاک را با الکل ۷۰ درصد شستشو و سپس در هوای آزاد قرار داده تا خشک شود بعد از این مرحله بر روی رسوب به مقدار ۵۰ میکرولیتر از بافر TE و یا آب مقطر اضافه گردید و برای استفاده در مراحل بعدی در ۲۰ - درجه سانتی گراد و ازت مایع و همچنین فریزر منهای ۸۶ نگهداری شدند.

۲-۲-۳-۳ - روش استخراج Total DNA بدون استفاده از فنل (Cattaneo 1997)

در این روش که سریعتر از روش قبلی می باشد ابتدا mg ۵۰ از بافت عضلانی فیکس شده در اتانول خالص را در داخل تیوبهای ۱/۵ لیتری بصورت خرد شده قرار داده و سپس بر روی آن مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر از محلول STE اضافه کرده همچنین به میزان ۶ میکرولیتر پروتئیناز k (۱۰mg/ml) و ۲۰ میکرو لیتر SDS ۲۰٪ اضافه کرده و تیوبها را در ترمیکسر ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده و پس از هضم سلولها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آمونیوم استات ۷/۵ مولار بر روی محلول داخل تیوب اضافه کرده و پس از هم زدن، نمونه ها را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۲۰۰ دور در ثانیه سانتریفوژ کرده و محلول رویی را به تیوپهای جدید انتقال داده به میزان ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه کرده و عمل هم زدن و سانتریفوژ مجدداً تکرار می شود در نهایت محلول رویی دور ریخته شده و رسوبات جدار لوله و ته لوله با الکل °۷۰ درجه شستشو داده شده و پس از آبگیری توسط کاغذ صافی جهت خشک شدن در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده می شود که در نهایت بر روی رسوب به میزان ۵۰ میکرولیتر از بافر TE اضافه گردیده و برای استفاده در مراحل بعدی در ۴ درجه سانتی یا ۲۰- گراد نگهداری شدند.

۳-۳-۳- الکتروفورز DNA استخراج شده

الکتروفورز تکنیکی است که از طریق آن ذرات باردار در یک میدان الکتریکی از یکدیگر جدا می‌شوند. مولکولهای نظیر آمینو اسیدها و پروتئین به دلیل داشتن گروههای قابل یونیزاسیون می‌توانند در محیطهای بافری مختلف از نقطه نظر ایزوالکتریک آنها دارای بار الکتریکی مثبت یا منفی باشند.

بنابراین چنانچه این مولکولها تحت تاثیر میدان الکتریکی مناسب قرار گیرند می‌توانند به طرف الکترودها مهاجرت کنند. مولکولهایی که دارای بار یکسان ولی جرم مولکولی متفاوت هستند بدلیل تفاوت در نسبت جرم مولکولی به بار الکتریکی در میدان مناسب دارای سرعتهای مختلفی می‌باشند که این موضوع موجب جداسازی آنها میشود. به چنین فرایندی الکتروفورز می گویند.

در این تحقیق DNA استخراج شده از نمونه ها برای ارزیابی کمی یا کیفی با استفاده از ژل آگارز الکتروفورز شدند. برای این کار در حدود ۴-۳ میکرولیتراز محصول استخراج شده را با ۲ میکرولیتر LB(بافر سنگین کننده) به همراه ۷-۶ مایکرولیتر آب مقطر استریل شده مخلوط و ترکیب بدست آمده در چاهک های ایجاد شده در داخل ژل آگارز در تانک الکتروفورز قرار داده و الکتروفورز گردیدند. الکتروفورز با جریان ۷۵ میلی آمپر (دستگاه EPS) به مدت ۴۵ دقیقه انجام شده و سپس ژل با استفاده از دستگاه ظهور ژل (Gel Doccumentation) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۴-۳-۳ روش کار

جهت آماده کردن ژل آگارز با علم مشخص بودن حجم ظرفی که ژل در آن ریخته می شود و محلول TAE تهیه و با آب مقطر به نسبت ۱ به ۹ رقیق کرده و سپس بسته به غلظت ژل آگارز مورد نظر پودر آگارز بر روی محلول تهیه شده در داخل بشر ریخته و این ترکیب روی شعله تا وقتیکه رنگ آن شفاف شود هم زده می شود. بعد از کاهش درجه حرارت محلول به میزان ۱ میکرولیتر ایتدیوم بروماید (EtBr) به ازاء هر ۱۰ میل لیتر به محلول اضافه کرده و بعد از هم زدن ، محلول نسبتاً سرد شده داخل ظرف الکتروفورز حاوی شانه ریخته شد. ظرف ژل را در مکانی که دارای تراز یکنواخت باشد قرار داده تا محلول ژل ببندد. عمدتاً بعد از ۱۵ دقیقه ژل سفت شده و شانه را از داخل ژل خارج و ژل را در داخل دستگاه الکتروفورز قرار داده شد. بعد از قرار دادن ژل در داخل دستگاه الکتروفورز و اتمام کار الکتروفورز آنگاه ژل را از دستگاه خارج کرده و جهت بررسی کیفیت DNA زیر اشعه UV (با استفاده از سیستم مستند ساز ژل) قرار داده تا با استفاده از خاصیت فلورسنت ایجاد شده باند DNA مورد ارزیابی قرار گیرد.

۱-۴-۳-۳ - بررسی کمی و کیفی DNA استخراجی

غلظت نمونه های DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری میشود تا مقادیری که در مرحله PCR بایستی استفاده شود معین شود. این عمل با استفاده از رابطه میزان جذب نوری (OD) نمونه ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر انجام میگیرد. همچنین خلوص DNA استخراجی نیز با دستگاه اسپکتروفتومتر و با استفاده از نسبت جذبی OD260/OD 280 تعیین میشود. بدین صورت که اگر DNA کافی برای سنجش از طریق اسپکترومتری وجود نداشته باشد (<250 ng/ml) یا اینکه نمونه DNA، با مواد دیگری آلوده شده باشد که نور را جذب و مانع آنالیزهای دقیق شود در این صورت راه سریعی که برای تعیین مقادیر DNA در این گونه نمونه ها وجود دارد استفاده از خاصیت فلورسنت نمونه DNA که با اتیدیوم بروماید آغشته شده است و در مقابل نور فرابنفش قرار داده شده است می باشد. چون شدت نور متناسب با کل DNA موجودات بنابراین مقدار DNA نمونه ها را می توان با مقایسه خاصیت نوردهی کلی DNA استفاده شده با یکسری از نمونه های استاندارد تشخیص داد. با این روش تا حدود ۵-۱ نانوگرم را می توان جدا کرد. (Sambrook, 1989).

همچنین جهت تعیین مقادیر DNA یا RNA از طریق استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر بایستی جذب نوری نمونه در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت شود. جذب نوری نمونه در طول موج ۲۶۰ نانومتر نشاندهنده غلظت اسید نوکلئیک نمونه میباشد بصورتیکه اگر جذب نوری نمونه‌ای از DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر برابر با یک شود نشاندهنده وجود تقریباً ۵۰ µg/ml از DNA دو رشته ای در محلول و ۴۰ µg/ml از DNA تک رشته ای و۲۰ µg/ml از الیگو نوکلئوتید تک رشته‌ای می باشد. همچنین نسبت بین جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر (OD260/OD280) برای سنجش خلوص اسیدهای نوکلئیک بکار می‌رود بطوریکه این نسبت در مورد DNA خالص برابر ۱/۸ و در مورد RNA برابر ۲ می باشد.

چنانچه نمونه‌ای حاوی پروتئین یا فنل باشد این نسبت برای DNA و RNA پایین تر از مقادیر گفته شده خواهد بود و تشخیص دقیق میزان اسیدهای نوکلئیک ممکن نخواهد بود.

شکل ۹ : قرار گرفتن رک های حاوی ذخیره ماده ژنتیکی DNA و بافت های ۵ گونه میگوی مورد مطالعه در فریزر ۸۶-

۲-۴-۳- ۳ - آغازگرها

آغازگر مورد استفاده در این تحقیق توسط شرکت metabition international AG آلمان سنتز شده است (جدول۲). آغازگر طبق دستور شرکت سازنده با غلظت 100 pm/µl در آب مقطر حل شد (Tong *et al.*, Palumbi and Benzi 1991 2000), Palumbi *et al.* (1991).

جدول۲ - آغازگر مورد استفاده در PCR ژن 16SrRNA و همچنین COI

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر
16Sar	5′-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3′
16Sbr	5′-CCG GTY TGA ACT CAG ATC AYG T−3′
COIP4	5’-AGGAAATGTTGAGGGAAG AAATAA-3’
COIf	5’-TAA CCTGCAGGAGGAGGAG AYCC-3’

۳-۴-۳-۳- نحوه محاسبه Tm و Ta

برای تخمین درجه حرارت مناسب جهت برقراری اتصالات رشته الگو و آغازگرها می توان از درجه حرارت ذوب (Tm) در رابطه با درجه حرارت اتصال (Ta) استفاده کرد. Tm درجه حرارتی است که در آن بازهای مکمل از هم جدا می شوند (ذوب می شوند) . (Untergrasser *et al*., 2007, Wallace *et al*., 1979)

جهت تعیین دمای ذوب می توان از فرمول زیر استفاده کرد.

$$Tm= 40C(C+G) +20C (A+T)$$

معمولاً دمایی معادل ۲-۱ درجه سانتی گراد کمتر از دمای ذوب کافی است تا مجال دو رگه سازی صحیح بین آغازگرها و رشته‌های الگو حاصل شود ولی در عمل یک محدوده ۱۰-۸ درجه سانتی گرادی پایین تر از Tm جهت اطمینان از حصول بهترین نتیجه استفاده و آزمایش می‌شود.

در این تحقیق توالی نوکلئوتیدی آغازگرها (پرایمر ها) مورد اشاره از طریق جستجوی اینترنتی از بانک ژنی تهیه گردید.

جهت انجام PCR ابتدا بافر ها و محلول های dNTP پس از خروج از فریزر در شرایط دمایی اطاق در زیر هود لامینار قرار داده تا از حالت انجماد خارج شود و جهت یکسان سازی ، مواد به مدت نیم دقیقه ورتکس گردید. و برای هر نمونه یک ویال ۰.۲ میلی لیتری استریل انتخاب و شماره گذاری گردید.

سپس بر روی یخ ترکیبات مورد نیاز برای انجام عمل PCR با مقادیر مربوطه افزوده شد. محتویات ویال ها توسط سمپلر بخوبی به هم زده و ویالها جهت ته نشین شدن محتویات به مدت ۱۰ ثانیه سانتریوفوژ گردید. در این راستا در حدود ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده در یک واکنش به میزان ۲۵ ماکرولیتر حاوی ۰.۶ ماکرولیتر از پرایمر های Forward و Reverse (پیشرو و معکوس) ، ۲۵ میلی مولار MgCl2 ، ۱۰ میلی مولار dNTP(Promega USA) ، 5X PCR buffer (Promega) و ۵ واحد از Taq DNA polymerase (Promega) استفاده گردید.جهت بهینه کردن عملیات PCR ، در مرحله اول با دادن دامنه حرارتی ، بهترین دمای اتصال (Annealing Temperature) هر کدام از آغاز گرها به رشته الگو بدست آمد و در مرحله بعد جهت اخذ بهترین و شفاف ترین باندها و حذف باند های ناخواسته اقدام به اپتیماز کردن محصول PCR از طریق تغییر غلظتهای MgCl2 ، DNA ژنومی و dNTP گردید.جهت تعین بهترین غلظت های ممکن در مقدار غلظت MgCl2 عملیات PCR طبق جدول شماره ۳ انجام گردید.

جدول۳- پروفایل غلظت مواد مورد استفاده برای انجام عمل PCR

	Mm ۱.۵ MgCl2	X۱۴	Mm۲.۰۰ MgCl2	X۱۴	Mm۲.۵ MgCl2	X۱۴	Mm۳.۰۰ MgCl2	X۱۴
D Water	۶/۲۰	۸۶.۸	۵/۹۵	۸۳/۳	۵.۷۰	۷۹.۸	۵/۴۵	۷۶/۳
Mm Mgcl2۲۵	۰/۷۵	۱۰/۵	۱.۰۰	۱۴	۱.۲۵	۱۷/۵	۱/۵۰	۲۱
5X Buffer	۲/۵۰	۳۵	۲/۵۰	۳۵	۲/۵۰	۳۵	۲/۵۰	۳۵
Mm dNTP۲	۱/۲۵	۱۷/۵	۱.۲۵	۱۷/۵	۱.۲۵	۱۷/۵	۱.۲۵	۱۷/۵
10 µm F	۰/۵۰	۷/۰	۰/۵۰	۷/۰	۰/۵۰	۷/۰	۰/۵۰	۷/۰
10 µm R	۰/۵۰	۷/۰	۰/۵۰	۷/۰	۰/۵۰	۷/۰	۰/۵۰	۷/۰
Temp. DNA	۰/۷۵		۰/۷۵		۰/۷۵		۰/۷۵	
ml ۵µ/ Taq.	۰/۵۰	۰/۷	۰/۵۰	۰/۷	۰/۵۰	۰/۷	۰/۵۰	۰/۷
Total	۱۲/۵		۱۲/۵		۱۲/۵		۱۲/۵	

محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز ۲ درصد و رنگ آمیزی ایتیدیوم بروماید و با استفاده از اشعه UV مورد ارزیابی قرار گرفت. سیکل حرارتی مورد استفاده در دستگاه PCR شامل سیکل اولیه ۹۴ درجه به مدت ۴.۳۰ دقیقه ، به دنبال آن ۴۰ سیکل شامل دماهای واسرشته سازی (denaturation) ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه ، اتصال (annealing) ۴۵ ثانیه در دماهای اختصاصی برای هر پرایمر ، بسط و تکثیر(Extension) ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و در آخر دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود(جداول ۴ و ۵).

جدول ۴: برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن 16SrRNA

مراحل PCR	دما (درجه سانتیگراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشته سازی اولیه	۹۵	۳ دقیقه	۱
واسرشته سازی	۹۵	۳۰ ثانیه	۳۰
الحاق	۵۴	۴۵ ثانیه	
بسط	۷۲	۶۰ ثانیه	
بسط نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

جدول۵: برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن COI

مراحل PCR	دما (درجه سانتیگراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشته سازی اولیه	۹۵	۳ دقیقه	۱
واسرشته سازی	۹۵	۳۰ ثانیه	۳۰
الحاق	۵۶	۴۵ ثانیه	
بسط	۷۲	۶۰ ثانیه	
بسط نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

پس از توالی‌یابی با استفاده از نرم افزار BioEdit و ابزار قدرتمند Blast و رویه Blasten در پایگاه NCBI میزان همولوژی توالی‌های بدست آمده سنجیده شد. پس از دریافت توالی ها، بازنگری توالی های مشابه با نرم افزار Chromas 2.23 انجام شد. به منظور شناسایی اختلاف میان توالی ها، نمونه های توالی یابی شده با نرم افزار Clustal W هم ردیف و آنالیز و رسم درخت فایلوژنی و میزان فاصله ژنتیکی گونه های مورد نظر با استفاده از نرم افزار MEGA 5 محاسبه شدند (Thompson 1997).

۴- نتایج

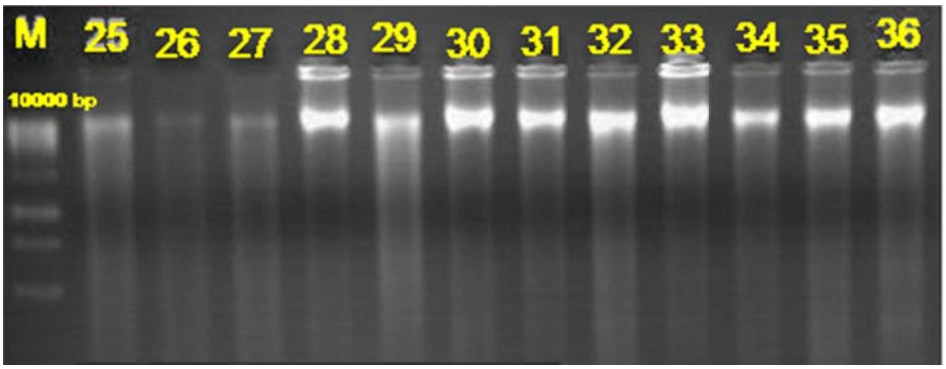
۴-۱ - ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

۴-۱-۱- روش الکتروفورز

استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم از بافت پای شنای ۵ گونه از میگوهای مورد مطالعه انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب با دو روش استفاده از ژل آگارز یک درصد و مشاهده با اشعه ماوراء بنفش و دستگاه اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت .

وجود یک باند قوی و باریک بر روی ژل اگارز بدون شکستگی و یا اسمیر حاکی از یک استخراج مناسب دارد.

همانطور که در شکل زیر ملاحظه میگردد ، DNAهای استخراج شده از پای شنای نمونه های میگو به روش فنل-کلروفرم کیفیت مناسبی جهت استفاده برای انجام PCR دارد.وجود باندهای شارپ و شفاف نشاندهنده آنست که DNA استخراجی فاقد آلودگی پروتیینی ، فنلی و یا آلودگی به RNA است.



شکل ۱۰: استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم

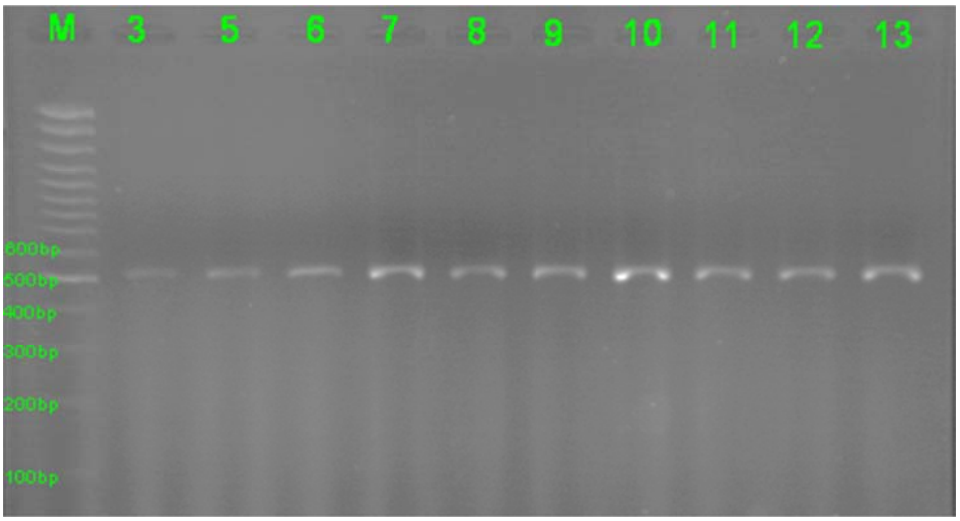
۴-۱-۲- ارزیابی کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری

میزان جذب نوری DNA استخراج شده در تمامی نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر برای تعیین کمیت و نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به طول موج ۲۸۰ نانومتر برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. بر اساس نتایج به دست آمده، نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به طول موج ۲۸۰ نانومتر در نمونه ها بین ۱/۸– ۲/۱ قرار داشت که نشانگر کیفیت خوب DNA نمونه ها بود.

۴-۲ - تکثیر و مقایسه توالی‌های 16SrRNA

۴-۲-۱ - تکثیر ژن 16SrRNA

بهینه سازی واکنش PCR جهت تکثیر ژن 16SrRNA با استفاده از گرادیانت دمایی ۶۰- ۴۸ درجه سانتیگراد نشان داد که مناسب‌ترین دما برای اتصال آغازگر، دمای ۴۸ درجه سانتیگراد است. آغازگرهای 16Sar5′ و 16Sbr3′ امکان تکثیر بخشی از ژن 16SrRNA به طول تقریبی ۵۲۰ جفت باز را فراهم نمودند. الگوی باندی محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد در شکل زیر نمایش داده شده است.



شکل ۱۱: الگوی باندی محصول PCR ژن 16SrRNA روی ژل آگارز یک درصد

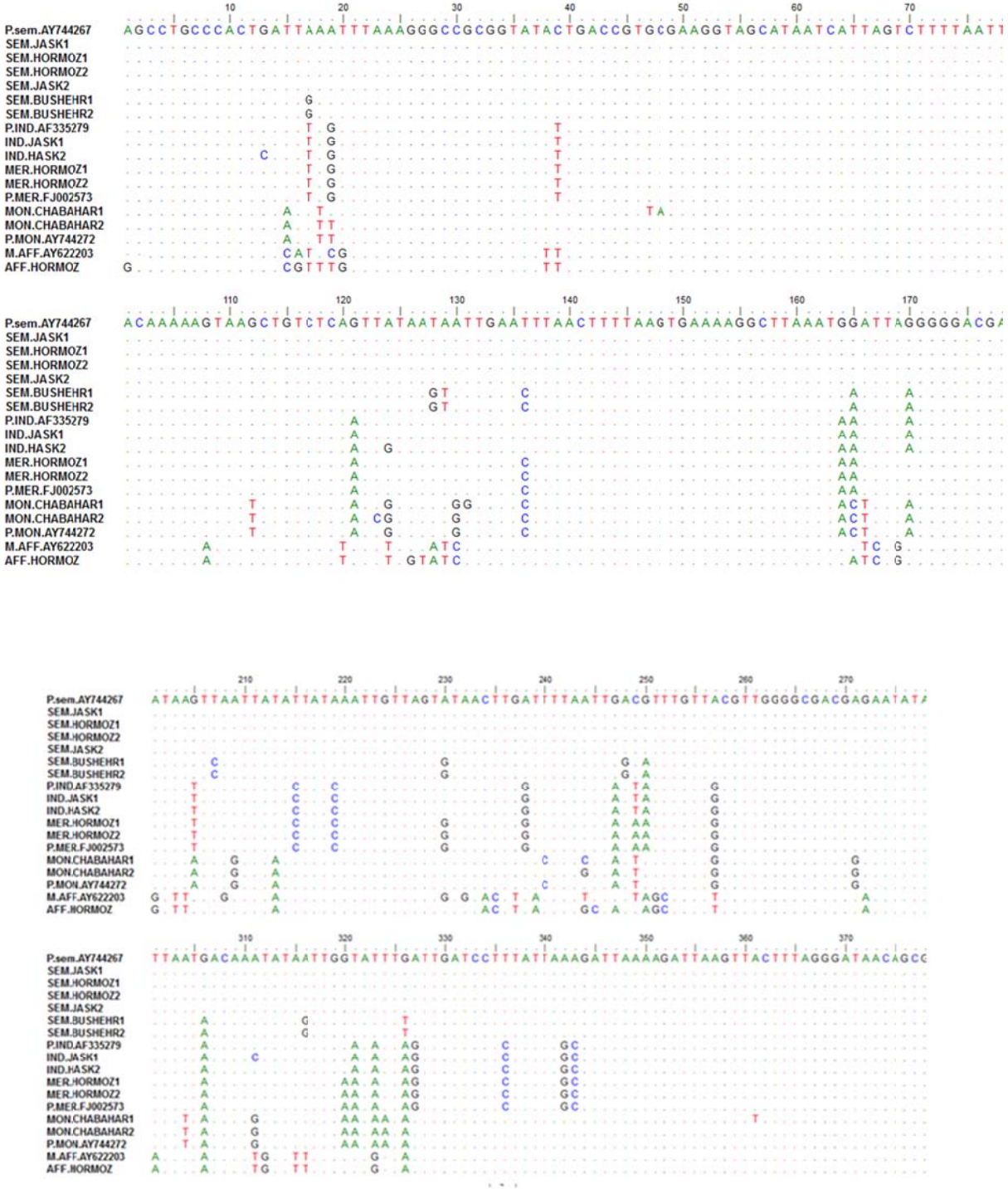
۴-۲-۲ - نتایج حاصل از تعیین توالی ژن 16SrRNA

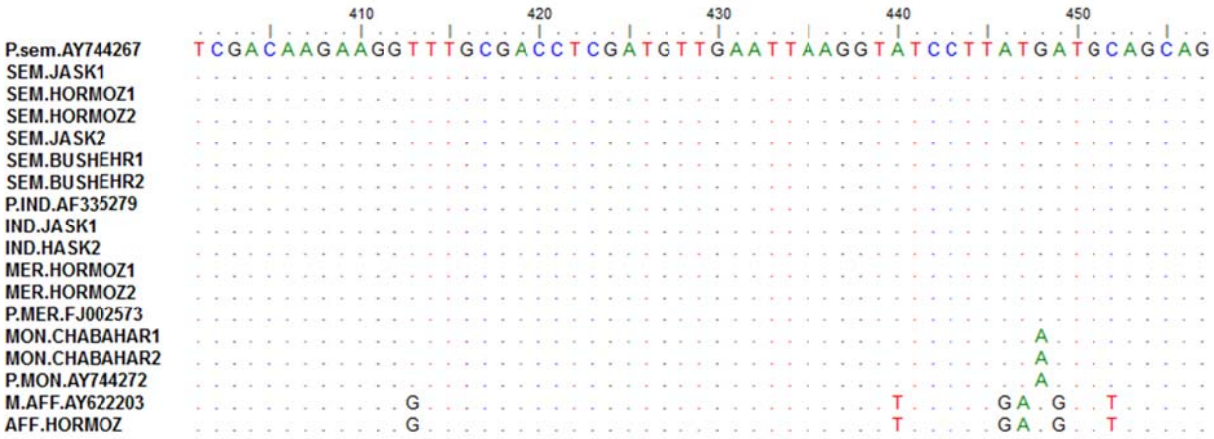
نتایج حاصل از تعیین توالی 16SrRNA با استفاده از پرایمر Forward، به صورت اختصاصی به دو شکل کروماتوگرام و fasta دریافت گردید. پس از دریافت توالی ها، بازنگری و بازسازی توالی های مشابه با استفاده از توالیهای Reverse و در جهت اصلاح اشتباهات احتمالی در هنگام sequencing انجام شد که نتایج آن به شرح ذیل می باشد.

۴-۲-۳ - هم ردیفی توالی‌های بازسازی شده با استفاده از Clustal W

هم ردیفی تمام توالی‌های 16SrRNA گونه مورد مطالعه و دریافت اطلاعات بصورت فایل کروماس، با استفاده از ابزار Clustal W موجود در نرم افزار Mega 4 انجام شد. توالی‌های فوق به اندازه ۴۸۰ باز ردیف شدند.

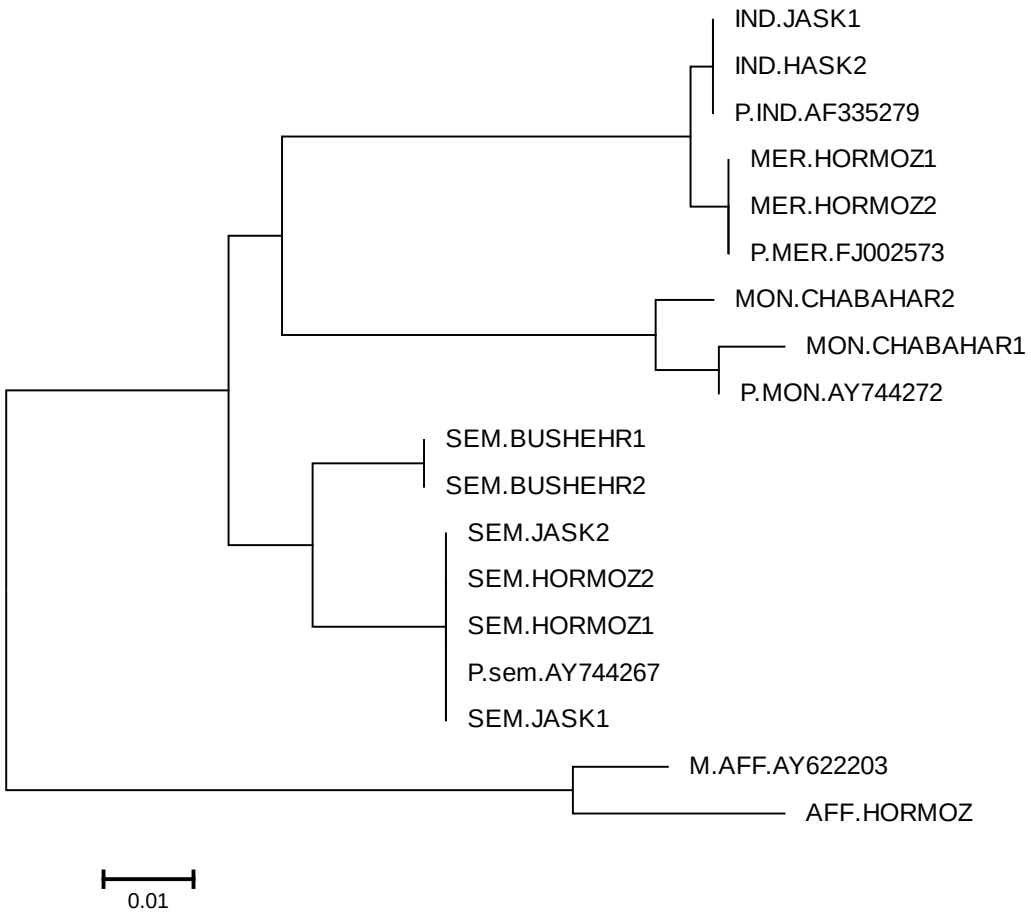
شکل ۱۲: همردیفی توالی‌های 16SrRNA گونه های مختلف میگو در مناطق مورد مطالعه



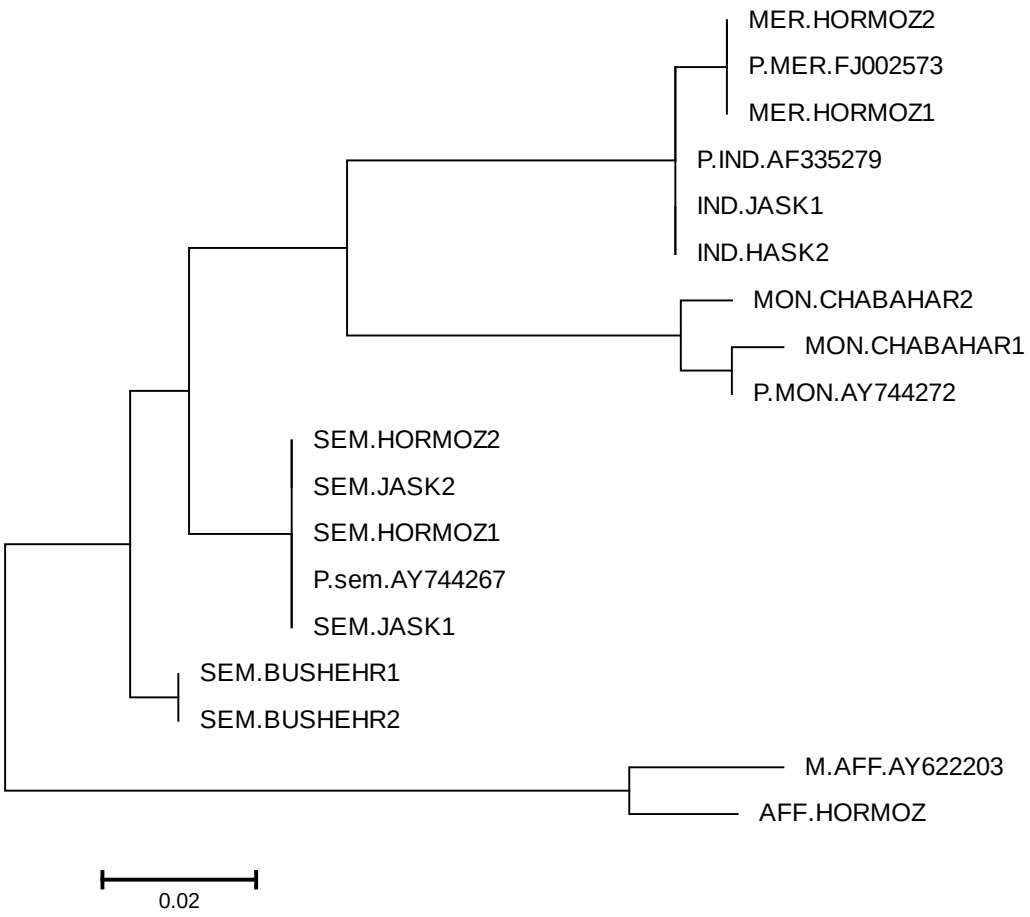

410
420
430
440
450
P.sem.AY744267 TCGACAAGAAGGTTTGCGACCTCGATGTTGAATTAAGGTATCCTTATGATGCAGCAG
SEM.JASK1
SEM.HORMOZ1
SEM.HORMOZ2
SEM.JASK2
SEM.BUSHEHR1
SEM.BUSHEHR2
P.IND.AF335279
IND.JASK1
IND.HASK2
MER.HORMOZ1
MER.HORMOZ2
P.MER.FJ002573
MON.CHABAHAR1
MON.CHABAHAR2
P.MON.AY744272
M.AFF.AY622203
AFF.HORMOZ

۴-۲-۴ - ترسیم درخت تکاملی

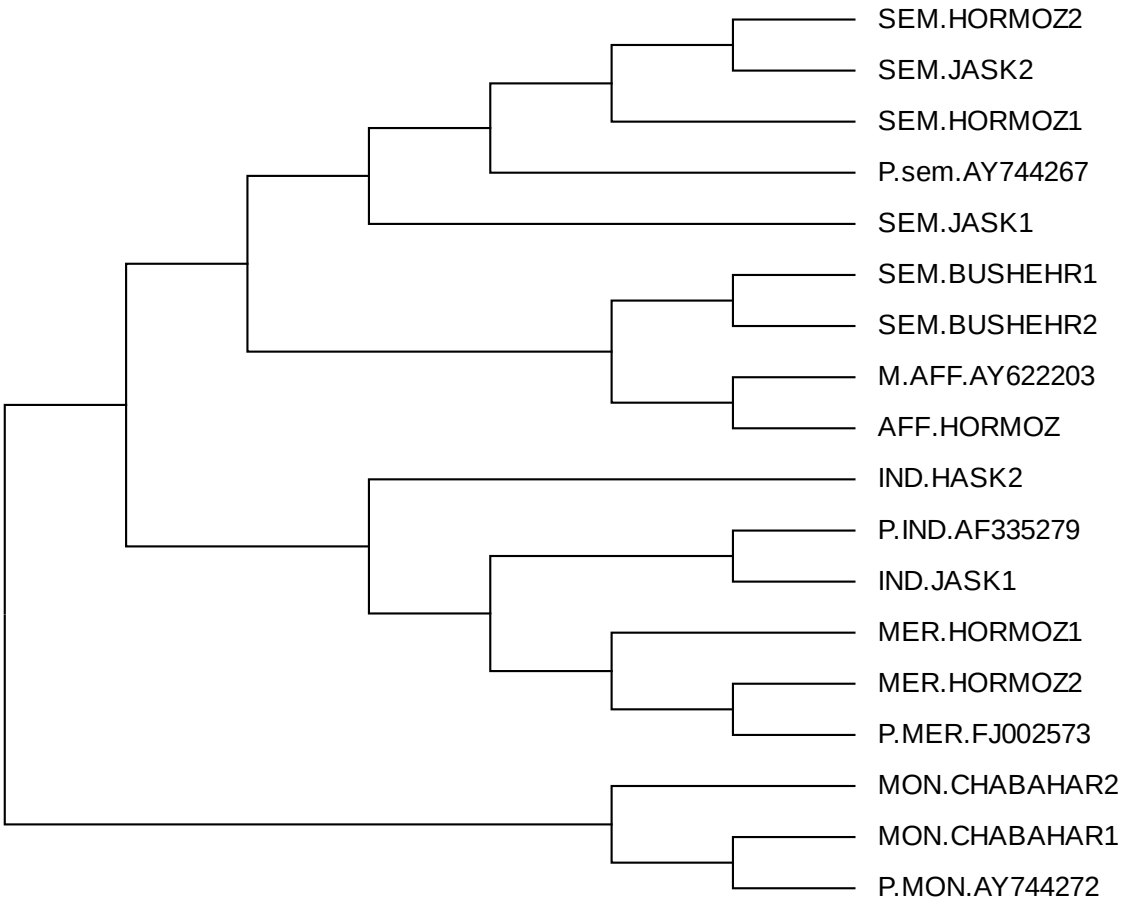
وضعیت جغرافیایی (topology) حاصل از ترسیم درخت تکاملی Neighbor-Joining به روش فاصله Kimura 2-parameter بسیار عمیق بود که وجود سه کلاستر اصلی را نشان داد که نمونه های گونه های مونودون ، مرگوپینسیس و اینديکوس همگی در شاخه اول قرار گرفتند. در شاخه دوم نمونه های میگوی سمیسولکاتوس در قالب دو واریته مجزا (بوشهر و هرمزگان) به صورت مشترک قرار داشتند و نمونه های میگوی آفینیس بصورت یک گروه جداگانه در قالب جنس متفاوت (متاپنئوس) بصورت Out Group قرار گرفتند. (شکل ۱۳).



شکل۱۳: درخت تکاملی ژن 16SrRNA میگوهای مورد مطالعه به روش Neighbor-Joining



شکل ۱۴: درخت تکاملی ژن 16SrRNA میگوهای مورد مطالعه به روش Maximum Liklihood



شکل۱۵: درخت تکاملی ژن 16SrRNA میگوهای مورد مطالعه به روش Maximum Parsimoney

جدول ۶ : درصد فاصله ژنتیکی با استفاده از ژن 16s دربین گونه های مختلف ثبت شده

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. P.sem.AY744267																		
2. SEM.JASK1	0.00																	
3. SEM.HORMOZ1	0.00	0.00																
4. SEM.HORMOZ2	0.00	0.00	0.00															
5. SEM.JASK2	0.00	0.00	0.00	0.00														
6. SEM.BUSHEHR1	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03													
7. SEM.BUSHEHR2	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.00												
8. P.IND.AF335279	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08											
9. IND.JASK1	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.00										
10. IND.HASK2	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.00	0.00									
11. MER.HORMOZ1	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.01	0.01	0.01								
12. MER.HORMOZ2	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.01	0.01	0.01	0.00							
13. P.MER.FJ002573	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00						
14. MON.CHABAHAR1	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10	0.10	0.11	0.11	0.11					
15. MON.CHABAHAR2	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10	0.10	0.02				
16. P.MON.AY744272	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10	0.10	0.01	0.01			
17. M.AFF.AY622203	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.12	0.12	0.15	0.15	0.15	0.16	0.16	0.16	0.15	0.14	0.14		
18. AFF.HORMOZ	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.12	0.12	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.17	0.16	0.16	0.03	

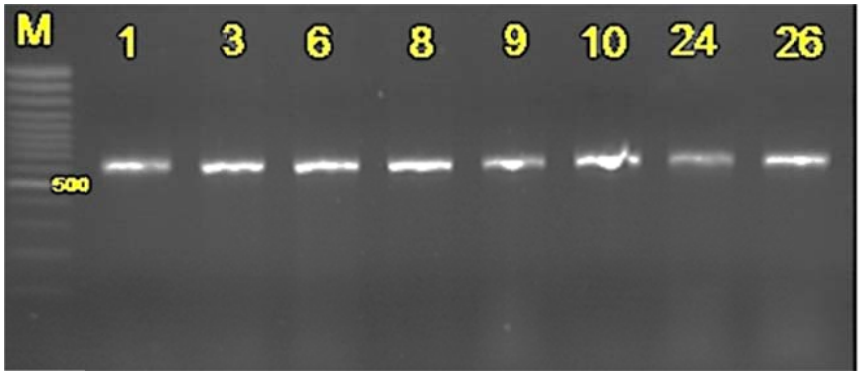
جدول۷: ترکیب نوکلوتیدی توالی های ژن 16SrRNA میگوی در مناطق مورد مطالعه

	T(U)	C	A	G	Total
P.sem.AY744267	33.3	12.5	33.5	20.8	457.0
SEM.JASK1	33.3	12.5	33.5	20.8	457.0
SEM.HORMOZ1	33.3	12.5	33.5	20.8	457.0
SEM.HORMOZ2	33.3	12.5	33.5	20.8	457.0
SEM.JASK2	33.3	12.5	33.5	20.8	457.0
SEM.BUSHEHR1	33.7	12.3	33.0	21.0	457.0
SEM.BUSHEHR2	33.7	12.3	33.0	21.0	457.0
P.IND.AF335279	33.5	12.9	33.7	19.9	457.0
IND.JASK1	33.5	13.1	33.5	19.9	457.0
IND.HASK2	33.5	13.1	33.5	19.9	457.0
MER.HORMOZ1	33.0	13.1	33.7	20.1	457.0
MER.HORMOZ2	33.0	13.1	33.5	20.4	457.0
P.MER.FJ002573	33.0	13.1	33.7	20.1	457.0
MON.CHABAHAR1	33.3	13.1	34.4	19.3	457.0
MON.CHABAHAR2	33.3	13.1	34.1	19.5	457.0
P.MON.AY744272	33.3	13.1	34.4	19.3	457.0
M.AFF.AY622203	35.1	12.8	30.2	21.9	453.0
AFF.HORMOZ	35.2	12.6	30.3	21.9	452.0
Avg.	33.5	12.8	33.2	20.4	456.5

۴-۳ - تکثیر و مقایسه توالی‌های ژن COI

۴-۳-۱ - تکثیر ژن COI

بهینه سازی واکنش PCR جهت تکثیر ژن COI با استفاده از گرادیانت دمایی ۶۰- ۴۸ درجه سانتیگراد نشان اد که مناسب‌ترین دما برای اتصال آغازگر، دمای ۴۸ درجه سانتیگراد است. آغازگرهای COfI و COI P4امکان تکثیر بخشی از ژنCOI به طول تقریبی ۵۸۰ جفت باز را فراهم نمودند. الگوی باندی محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد در شکل زیر نمایش داده شده است.



شکل ۱۶: الگوی باندی محصول PCR ژن COI روی ژل آگارز یک درصد

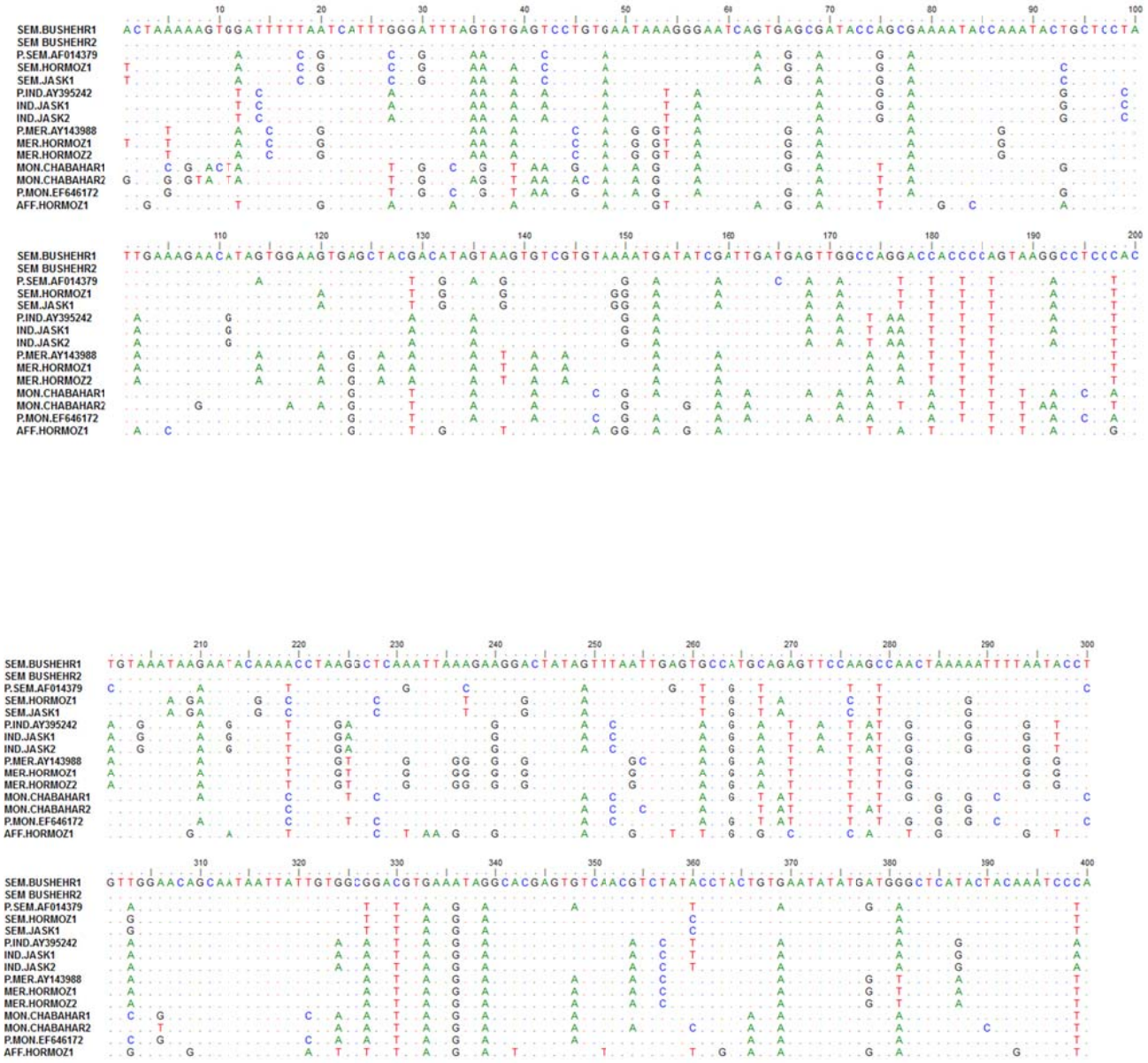
۴-۳-۲ - نتایج حاصل از تعیین توالی ژن COI

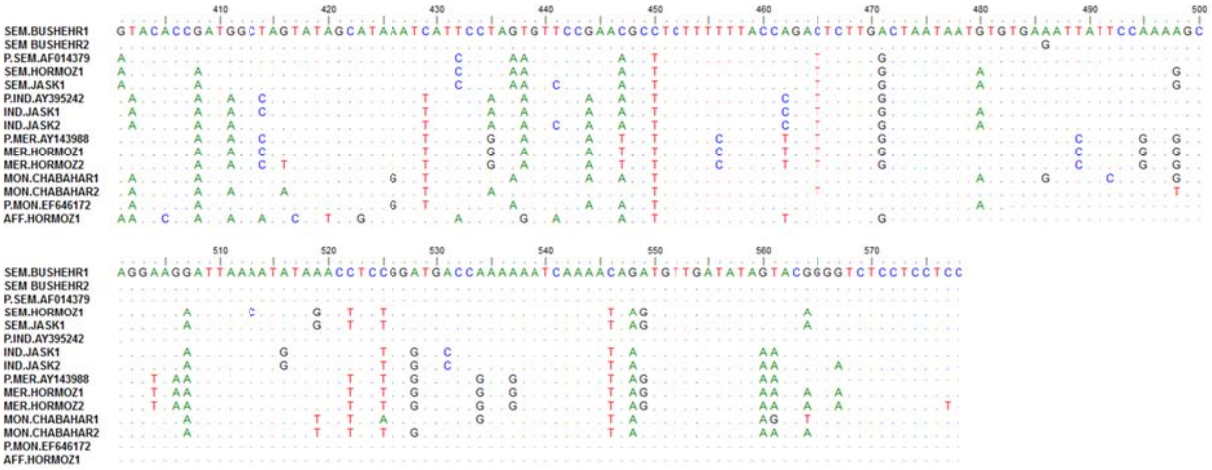
نتایج حاصل از تعیین توالی COI با استفاده از پرایمر Forward، به صورت اختصاصی به دو شکل کروماتوگرام و fasta دریافت گردید. پس از دریافت توالی ها، بازنگری و بازسازی توالی های مشابه انجام شد که نتایج آن به شرح ذیل می باشد.

۴-۳-۳ - هم ردیفی توالی‌های بازسازی شده با استفاده از Clustal W

هم ردیفی تمام توالی‌های COI گونه های مورد مطالعه پس از دریافت اطلاعات بصورت فایل کروماس، با استفاده از ابزار Clustal W موجود در نرم افزار Mega 4 انجام شد. توالی‌های فوق به اندازه ۵۸۰ باز ردیف شدند.

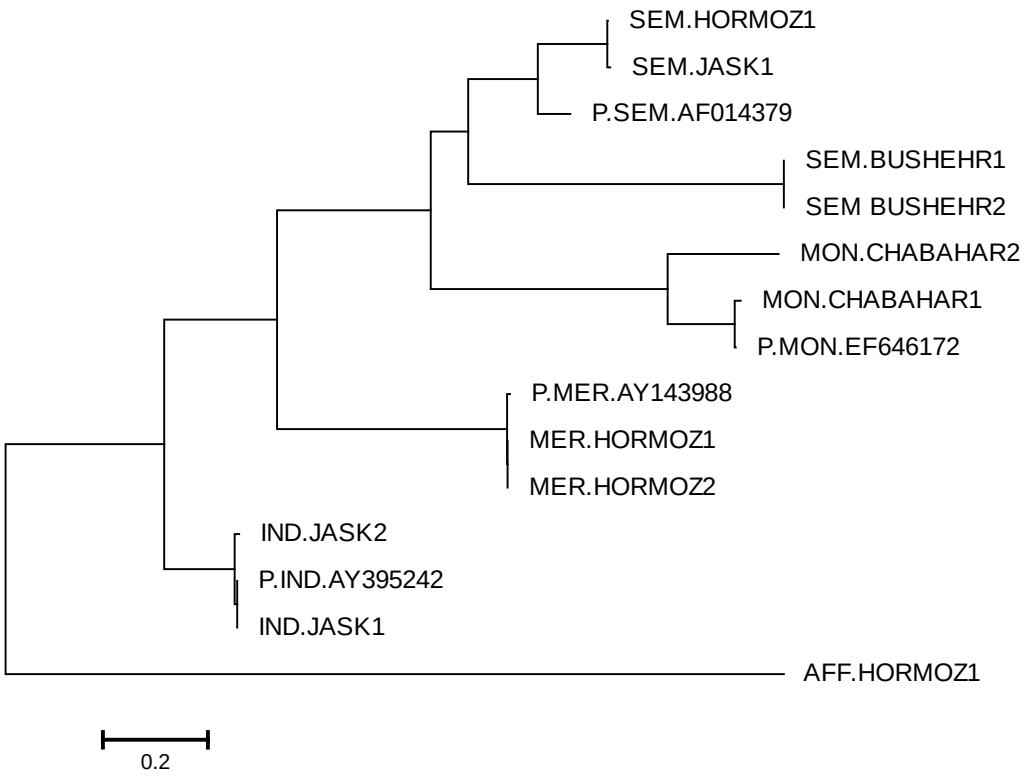
شکل ۱۷: همردیفی توالی‌های COI گونه های مختلف میگو در مناطق مورد مطالعه



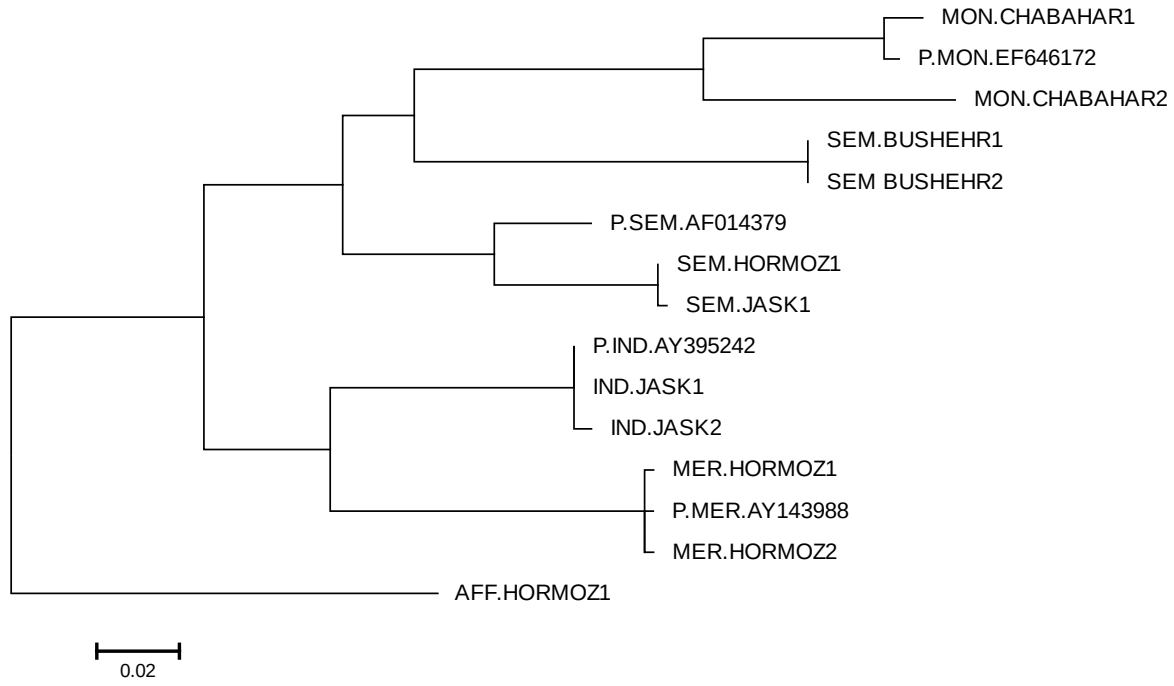

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
SEM.BUSHEHR1 GTACACCGATGGCTAGTATAGCATAAATCATTCCTAGTGTTCCGAACGCCTCTTTTTTACCAGACTCTTGACTAATAATGTGTGAAATTATTCCAAAAGC
SEM BUSHEHR2
P.SEM.AF014379
SEM.HORMOZ1
SEM.JASK1
P.IND.AY395242
IND.JASK1
IND.JASK2
P.MER.AY143988
MER.HORMOZ1
MER.HORMOZ2
MON.CHABAHAR1
MON.CHABAHAR2
P.MON.EF646172
AFF.HORMOZ1
510 520 530 540 550 560 570
SEM.BUSHEHR1 AGGAAGGATTAAAATATAAACCTCCGGATGACCAAAAAATCAAAACAGATGTTGATATAGTACGGGGTCTCCTCCTCC
SEM BUSHEHR2
P.SEM.AF014379
SEM.HORMOZ1
SEM.JASK1
P.IND.AY395242
IND.JASK1
IND.JASK2
P.MER.AY143988
MER.HORMOZ1
MER.HORMOZ2
MON.CHABAHAR1
MON.CHABAHAR2
P.MON.EF646172
AFF.HORMOZ1

۴-۳-۴ - ترسیم درخت تکاملی

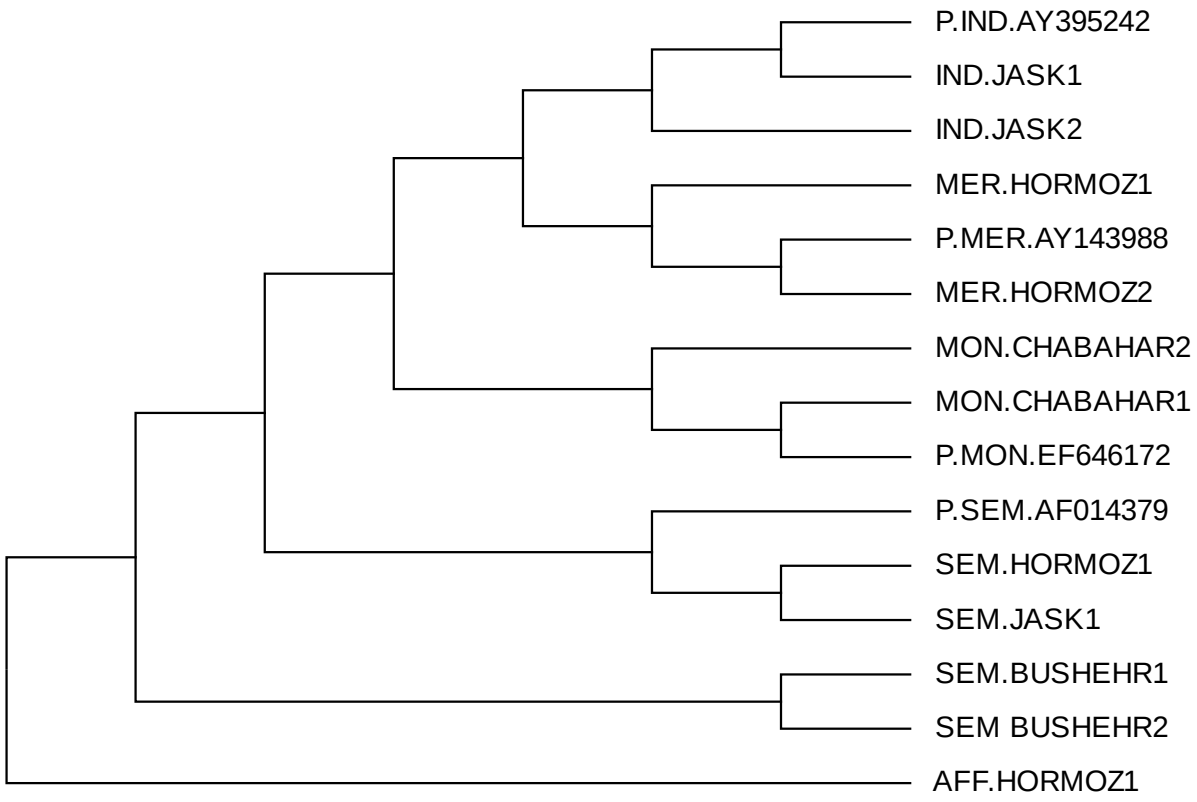
وضعیت جغرافیایی (topology) حاصل از ترسیم درخت تکاملی Neighbor-Joining به روش فاصله Kimura 2-parameter نیز برای ژن COI انجام گرفت که در نهایت وجود سه کلاستر اصلی را نشان داد که نمونه های گونه های مونودون و دو واریته از میگوی سمی سولکاتوس در یک گروه خواهری قرار گرفته و بهمراه گونه مرگوییسیس شاخه اول را ایجاد کردند. در شاخه دوم نمونه های میگوی ایندیکوس قرار داشتند و نمونه میگوی آفینیس بصورت یک گروه جداگانه در قالب جنس متفاوت (متاپنئوس) بصورت Out Group قرار گرفتند.



شکل۱۸: درخت تکاملی ژن COI میگوهای مورد مطالعه به روش Neighbor-Joining



شکل ۱۹: درخت تکاملی ژن COI میگوهای مورد مطالعه به روش Maximum Liklihood



شکل ۲۰: درخت تکاملی ژن COI میگوهای مورد مطالعه به روش Maximum Parsimoney

جدول۸: درصد فاصله ژنتیکی با استفاده از ژن COI دربین گونه های مختلف ثبت شده

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. SEM.BUSHEHR1															
2. SEM BUSHEHR2	0.00														
3. P.SEM.AF014379	0.82	0.82													
4. SEM.HORMOZ1	0.84	0.84	0.19												
5. SEM.JASK1	0.84	0.84	0.20	0.01											
6. P.IND.AY395242	1.42	1.42	1.02	1.04	1.04										
7. IND.JASK1	1.42	1.42	1.02	1.04	1.04	0.00									
8. IND.JASK2	1.42	1.42	1.02	1.04	1.03	0.01	0.01								
9. P.MER.AY143988	1.26	1.26	1.06	1.21	1.21	0.74	0.74	0.75							
10. MER.HORMOZ1	1.25	1.25	1.05	1.21	1.21	0.73	0.73	0.75	0.01						
11. MER.HORMOZ2	1.25	1.25	1.05	1.21	1.21	0.73	0.73	0.75	0.01	0.00					
12. MON.CHABAHAR1	1.28	1.28	0.95	0.99	1.00	1.25	1.25	1.25	1.37	1.36	1.36				
13. MON.CHABAHAR2	1.21	1.21	1.00	0.99	1.00	1.36	1.36	1.36	1.41	1.41	1.41	0.33			
14. P.MON.EF646172	1.24	1.24	0.95	0.99	1.00	1.23	1.23	1.23	1.37	1.36	1.36	0.01	0.36		
15. AFF.HORMOZ1	2.89	2.89	2.15	2.25	2.25	1.92	1.92	1.92	2.61	2.62	2.62	2.62	2.98	2.61	

جدول ۹: ترکیب نوکلوتیدی توالی های ژن COI میگوی در مناطق مورد مطالعه

Domain: Data

	T(U)	C	A	G	Total
SEM.BUSHEHR1	26.1	18.7	34.9	20.2	578.0
SEM BUSHEHR2	26.1	18.7	34.8	20.4	578.0
P.SEM.AF014379	28.7	17.7	35.8	17.7	491.0
SEM.HORMOZ1	27.9	18.2	35.8	18.2	578.0
SEM.JASK1	27.7	18.2	36.0	18.2	578.0
P.IND.AY395242	26.7	17.2	38.9	17.2	501.0
IND.JASK1	26.3	17.5	39.1	17.1	578.0
IND.JASK2	26.3	17.3	39.3	17.0	577.0
P.MER.AY143988	27.4	16.5	37.1	19.0	563.0
MER.HORMOZ1	27.7	17.1	36.3	18.9	578.0
MER.HORMOZ2	27.9	16.8	36.6	18.7	577.0
MON.CHABAHAR1	26.3	18.5	38.1	17.1	578.0
MON.CHABAHAR2	28.5	17.3	38.6	15.6	578.0
P.MON.EF646172	26.6	18.3	37.6	17.6	482.0
AFF.HORMOZ1	27.8	18.5	31.8	21.9	471.0
Avg.	27.2	17.8	36.8	18.3	552.4

۵- بحث و نتیجه گیری

زیستگاه همچنان در اثر فعالیت های انسانی غیر قابل تحمل نابود میشوند، . یک دلیل برای حفاظت از تنوع ژنتیکی آبزیان تهیه بانک ژن است .گام نخست درتشکیل بانک ژن زنده آبزیان آگاهی و شناخت کامل از وضعیت ساختار ژنتیکی آنها است تا بتوان بر اساس مارکرهای ژنتیکی هریک از جمعیت ها را شناسایی و برای آن خزانه ژنی مجزا و تفکیک شده ای تشکیل داد در غیراینصورت تشکیل خزانه ژنی از آبزیان متعدد بی هویت ژنتیکی ایجاد خواهد گردید. ارتقاء بازده اقتصادی در سیستم های آبزی پروری ،عمیقاً به برنامه های اصلاح نژاد و آمیزش های هدفمند بین مولدین وابسته است.به همین دلیل امروزه اغلب مراکز بزرگ تکثیر مخصوصا میگو این برنامه ها را با هدف بهبود صفات رشد،بازماندگی و یا مقاومت در مقابل بیماری راه اندازی نموده اند.با اینحال این خطر همواره وجود دارد که در دراز مدت ،عدم شناسایی و ضعف مدیریت صحیح بر ذخایر ژنتیکی موجب افزایش ضریب همخونی در جمعیت های والدی در کارگاه های تکثیر گردد.افزایش ضریب همخونی باعث کاهش تنوع ژنتیکی میگردد که به نوبه خود توان پاسخ به انتخاب را در نسلهای آتی کاهش داده و در نهایت منجر به کاهش رشد ،بازماندگی و خصوصیات تولید مثلی خواهد شد.با توجه به زادآوری بالا در میگوها، در برنامه های آمیزش انتخابی، نیاز به تعداد اندکی مولد در لاین والدی وجود دارد که همین امر احتمال قرابت ژنتیکی والدین انتخاب شده از بین جمعیت پرتعداد پیش مولد را افزایش میدهد. بنا براین با اطلاع از ذخایر ژنتیکی و تولید بانک ژن از منابع ژنتیکی آبزیان مخصوصا میگو میتوان به افزایش تولید کمک کرد.

در بررسی و مطالعات ژنتیکی به یک منبع اولیه از DNA نیاز می باشد. جهت استخراج DNA از بافت های آبزیان روشهای مختلفی وجود دارد مثل روش فنل کلروفرم (Hillis and Moritz 1990)، روش اتانول (Shaw 1990)، کیت (McQuein et al.2000)، CTAB (Mayet al.1997) و روشهای دیگر. هر یک از روش های عنوان شده مزایا و معایبی دارند. در تحقیق حاضر جهت استخراج DNA از پای شنای میگوی های مورد مطالعه جهت استفاده در تهیه بانک ژن از روش فنل- کلروفرم استفاده گردید. DNA های استخراج شده دارای کیفیت و کمیت (۱۰۰ ماکروگرم در ماکرولیتر) قابل قبولی جهت انجام PCR بودند به طوری که تمامی محصول PCR روی ژل آگارز بدون هیچ گونه آلودگی پروتئینی و یا باند اضافه مشاهده شدند. Tagart *et, al.*, 1999). استفاده از روش فنل کلروفرم از متداول ترین روشها در اکثر آزمایشات مولکولی در جهت دستیابی به DNA با وزن مولکولی و کیفیت بالا در تهیه بانک ژن می-باشد و به رغم سمی بودن تعدادی از مواد مورد استفاده، برای بافت هایی که طولانی مدت در الکل یا فریزر نگهداری شده اند و یا دارای بافت چربی دار هستند روش مناسبی است که در آن نسبت به بقیه روش ها احتمال استخراج DNA خالص بیشتر است (Bonnauld et al.1994).

وانا و همکاران (2004) جهت استخراج DNA از بافت منجمد شده ماهیچه و بررسی مولکولی جمعیت های گونه میگوی موزی از روش فنل- کلروفرم استفاده نمودند. خامنامتونگ و همکاران (Khamnamtong et al.2009) نیز جهت بررسی ساختار ژنتیکی میگوی ببری سیاه از روش فنل- کلروفرم جهت استخراج DNA از پای منجمد شده میگو استفاده کردند. لی و همکاران (Li *et al*.2009) برای بررسی تنوع ژنتیکی میگوی چینی، استخراج DNA را از بافت ماهیچه ای میگو با استفاده از روش استاندارد فنل کلروفرم انجام دادند. کشاورزی (۱۳۹۲) نیز در بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی میگوی موزی در خوریات لافت و سیریک هرمزگان با استفاده از توالی یابی ژن 16SrRNA میتوکندریایی، از روش فنل کلروفرم جهت استخراج DNA از بافت پای شنای میگو استفاده نمودند. ذخیره مناسب و پایای نمونه های انسانی و جانوری ضامن تامین نمونه های تحقیقاتی مورد نیاز در این زمینه است. به این منظور از رو شهای مختلفی برای حفظ نمونه ها از جمله نگهداری در دمای -۷۰°C وهمچنین نگهداری در ازت مایع استفاده می شود. بر اساس استانداردهای موجود در منابع مختلف روش نگهداری در شرایط فاز بخار توصیه میشود. این روش نگهداری برای جلوگیری از آلودگی نمونه ها ی انسانی و جانوری به انواع مختلف میکروارگانیسمها بخصوص آلودگی به مایکوپلاسما و انواع ویروسها بیشترین کاربرد را دارد. در تهیه بانک ژن در این پروژه از از روش نگهداری نمونه ها در ازت مایع استفاده شد که دما درقسمتهای مختلف داخل تانک ثابت و یکسان است. تثبیت دما در فضای داخلی تانک یکی از محاسن اصلی آن برای نگهداری مناسب سلولها برای مدت زمان طولانی است.

در این مطالعه، دو ژن mtDNA ، 16S rRNA و COI، با موفقیت آمپلی فای و توالی شدند. دو روش مختلف تجزیه و تحلیل رابطه فایلوزنی یعنی درخت MP و NJ به منظور تعیین روابط بین اعضای این دو مورفوتایپ و دیگر گونه های مطالعه شده برای تهیه بانک ژن (گونه های Penaeus)استفاده شد.

یکی از اهداف مهم تهیه بانک ژن و حفاظت از گونه های بومی و اندمیک منطقه خلیج فارس میباشد . در این مطالعه داده ژن S rRNA۱۶ تفاوت های ژنتیکی نسبتا پایین با ۰۳/ تنوع نوکلئوتیدی (۳/٪ فواصل ژنتیکی) بین دو morphotypes از گونه ببری سبز را نشان دادند که مشخص کردید که واریته بوشهر از لحاظ گونه ای میتواند گونه اندمیک منطقه خلیج فارس باشد لذا لزوم تهیه بانک ژن این واریته اجتناب ناپذیر میباشد که در این پروژه از این گونه بافت و DNA تهیه گردید .

این توالی ها، قادر به تشخیص دو morphotypes به کلایدها(شاخه ها) ی مربوطه خود بودند. منطقه ژن S rRNA۱۶ شناخته شده است به با جهش کم حفظ شده و دارای یک نرخ پایین از تکامل میباشد (Mayer 1994).به این معنی که ممکن است این ژن را بیشتر برای افتراق بین گونه ای از درون گونه ای بکار برد. به این ترتیب، با تجزیه و تحلیل این ژن (16S r RNA) به نظر می رسد که دو morphotypes ممکن است دو گونه متفاوت باشد.

Maggioni و همکاران (۲۰۰۱) بر روی یک مورفوتیپ از میگوی صورتی، *Farfantepenaeus subtiliss* به عنوان "مورفوتیپ II" با استفاده از توالی ژن 16S rRNA مطالعاتی انجام دادند. این مطالعه واگرایی ژنتیکی بالایی (۴-۶ درصد) در هنگام مقایسه این مورفوتایپ با مورفوتیپ دوم و نسبت به دیگر گونه های Farfantepenaeus نشان داد. در این مطالعه همه هاپلوتیپ های semisulcatus در یک کلاد عمده تکی قرار گرفتند در حالی که مورفوتایپ متعلق به منطقه بوشهردر کلاید متمایز دیگر قرار گرفتند.

در مقابل واگرایی کم نوکلئوتیدی ژن 16s rRNA، تجزیه و تحلیل ژن COI نشان داد که واگرایی نسبتا بالایی در این ژن برای گونه های مختلف میگودر تهیه بانک ژن منطقه مخصوصا برای واریته بومی میگوی ببری سبز وجود دارد. در این مطالعه، تنوع بالا برای ژن COI. در ۷۶ سایت متفاوت، برای دو morphotypes از *semisulcatus* مشاهده شد. این یافته که به دنبال اختلاف مشاهده شده بوسیله ژن 16SrRN بدست آمد مهم بود زیرااختلاف ژنتیکی بدست آمده بوسیله ژن COI در واریته بومی میگویsemisulcatus به دست آمده در این مطالعه، با بیش از ۰/۱۷ فاصله ژنتیکی، نه تنها متفاوت از مورفوتیپ منطقه هرمز بوده، بلکه بسیار متفاوت از تمام گونه های دیگر شناخته شده متعلق به Penaeidea خانواده مانند *P.merguiensis*، *P.monodon* و P. indicus میباشند. در یک تحقیق تنوع خاص داخل از ۰-۳٪ در تجزیه و تحلیل توالی ژن COI 558bp بین مورفوتیپ جدید سوبتیلیس و ۱۳ گونه *Penaeus semisulcatus* و *P.merguiensis* و *P. indicus* مشاهده شد. (Baldwin et al, 1998). این مطالعه، ازتعیین توالی mtDNA از قطعات به منظور بررسی تفاوت های ژنتیکی بین گونه های میگو Penaeidae استفاده شد. داده های مشاهده شده نشان داده شده است تفاوت های ژنتیکی به طور غیر منتظره بالا (۲۴/۸٪ فواصل ژنتیکی) درژنوم میتوکندری (COI) از گونه Penaeus مورد تجزیه و تحلیل مشاهده شد. (Gasmao et al, 2000). برای ژن COI، ۱۳ هاپلوتیپ برای همه گونه مورد مطالعه بدست آمدو آنها در پنج کلاید جداگانه قرار گرفتند. تمام هاپلوتیپ های *semisulcatus* در یک کلاد قرار گرفتند در حالی که دو هاپلوتیپ از مورفوتیپ دیگردر کلاید دیگر قرار گرفتند. این آنالیز نشان داد که یک جدایی مورفوتایپی بین مورفوتایپهای اندمیک بوشهر وجود دارد.

Tsoو همکاران (2005) با استفاده از نشانگر mtDNA تفاوت بین دو واریته مورفوتایپهای P. japonicus را نشان دادند. این گونه به طور گسترده در سراسر منطقه هند و غرب اقیانوس آرام پراکنده شده است. دو مورفوتایپ با اختلاف مورفولوژیکی بالا، (معروف به,مورفوتایپهای اول و دوم)، در جنوب دریای چین یافت می شود. دو مورفوتایپ ها با الگوهای مختلف رنگ در کاراپاس معروف میباشند. با این حال، تفاوت جداگانه در صفات مورفومتریک بین آنها بر اساس اندازه گیری ۱۳ اندیس قابل اندازه گیری وجود داشت.

تجزیه و تحلیل DNA میتوکندری وضوح خوب واگرایی ژنتیکی میان گونه های مختلف مورد اقدام برای تهیه بانک ژن را نشان داد.. این نوع تحلیل را می توان به عنوان یک ابزار مهم برای در انتخاب مولدین در برنامه های اصلاحی

و همچنین باز سازی ذخایر این کونه ها استفاده کرد. در این موردمیبایست، مدیریت های مختلف در برنامه broodstocking باید برای دو مورفوتایپ ازگونه *P.semisulcatus* که به عنوان گونه اندمیک خلیج فارس مطرح میباشند اجرا گردد. علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان می دهد که دو مورفوتایپ میگوی ببری سبز می تواند به عنوان دو گونه جدا از جنبه های ژنتیکی در نظر گرفته شود.

با این حال، اگر داده ها در حال حاضر به دست آمده انعکاس واقعی از ترکیب ژنتیکی گونه های مورد استفاده در تهیه بانک ژن باشد میتوان استنتاج کرد که ترکیب ژنی گونه های مورد بررسی بسیار نزدیک به هم میباشد و ما بجر اختلاف زیادی که در گونه ببری سبز مشاهده کردیم در گونه های دیگر مشاهده نشدو هیچ سابقه قبلی از انتقال مولدین بین مناطق مختلف وجود ندارد. بنابراین، محتمل ترین توضیح برای این مشاهده انست که توزیع ژنی گونه های مختلف میگوهای پناییده یکسان است و بیشتر از یک منشا ژنی واحد طبعیت میکنند .

پیشنهادها

۱ – گونه های مهم و اقتصادی بیشتری (مخصوصا سخت پوستان بومی منطقه) در تهیه بانک ژن مورد توجه قرار گیرد.

۲ – در تهیه بانک ژن ،بانک سلولی آبزیان و تشکیل آزمایشگاه کشت سلول جانوری آبزیان خلیج فارس نیز به منظور دسترسی جامعه علمی کشور به رده های سلولی و هیبریدوماهایی که کاربرد آنها در واکسیناسیون و تحقیقات بنیادی - کاربردی مهم میباشد مورد توجه قرار گیرد.

۳ – اهدای بافت یا سلول های شاخص و بارزش ژنتیکی از طرف مراکز تحقیقاتی داخل و خارج از کشور مورد توجه قرار گیرد.

۴ - شناسائی ساختار ژنتیکی گونه های در معرض تهدید و در حال انقراض ، تهیه شناسنامه و ثبت کامپیوتری مشخصات سلولهای ذخیره شده و ساماندهی ساختار و تمرکز مدیریت بر منابع ژنتیکی آبزیان حوزه خلیج فارس و دریای عمان از طریق ایجاد یک شبکه منسجم ذخایر ژنتیکی آبزیان این منطقه با همکاری کشور های حوزه خلیج فارس و دریای عمان مورد توجه قرار گیرد.

۵ - حفظ و نگهداری گونه های مهم وقابل نگهداری در شرایط پایلوت و تکثیر آنها مورد توجه قرار گیرد .

۶ - انتقال بین گونه ای ژن‌های مطلوب از خویشاوندان وحشی به گونه های اهلی در آبزیان در برنامه های به نژادی مورد توجه قرار گیرد.

۷ - افزایش آگاهی های عمومی در زمینه حفاظت ذخایر ژنتیکی از طریق چاپ و انتشار کاتالوگ ها و اطلاعات لازم برای حفاظت و ارزیابی و بهره برداری منابع ژنتیکی آبزیان منطقه مورد بررسی و توجه قرار گیرد.

۸ - برگزاری کارگاه های آموزشی بین المللی سالانه (بیشتر با کشور های حوزه خلیج فارس و دریای عمان) در جهت بررسی وضعت موجود و حفاظت و ارزیابی و بهره برداری از منابع ژنتیکی آبزیان حوزه خلیج فارس و دریای عمان مورد بررسی و توجه قرار گیرد.

۹- ایجاد دبیرخانه ملی در جهت تهیه معاهده های بین المللی با کشور های منطقه ای ذیربط (حوزه خلیج فارس و دریای عمان) و مجامع جهانی در جهت حفظ منابع ژنتیکی آبزیان خلیج فارس و دریای عمان مورد بررسی و توجه قرار گیرد.

منابع

- تیرانی، ن.، تمدنی جهرمی، س.، روز بهانی، ش.، ۱۳۹۲. تنوع ژنتیکی ماهی سرخو منطقه خلیج فارس و دریای عمان توسط ژن 12SrRNA به روش تعیین توالی. همایش ملی علوم جانوران آبزی، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، ۵-۷ شهریور.
- خالدی، ه.، رضوانی گیل کلایی، س.، ذوالقرنین، ح.، سواری، ا.، صفاهیه، ع.، ۱۳۹۱. مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی در جمعیت راشگو معمولی (*Eleutheronema tetradactylum*) در خلیج فارس و دریای عمان به روش توالی یابی ژن 28SrRNA. مجله دامپزشکی ایران، ۸(۱): ۳۳-۴۱.
- دندانی ، ع، ۱۳۷۵ : تاریخچه و زیست شناسی میگوی موزی یا صورتی ، مجله آبزی پرور . شماره ۱۳ . بهار ۱۳۷۵.
- رهنما، ر.، حسینی، س.ج.، قاسمی، س.ا.، یاوری، و.، ذوالقرنین، ح.، متین فر، ع.، ۱۳۹۰. مقایسه مولکولی اولیه *P.(penaeus) semisulcatus* خلیج فارس و زیرگونه آن *P.(penaeus)semisulcatus* با استفاده از 16SrRNA میتوکندریایی. ژنتیک نوین، ۶(۲): ۲۳-۳۱.
- زرشناس، غ،۱۳۷۰ . گزارش ۶ ماهه پروژه بررسی منابع میگوی استان هرمزگان. موسسه تحقیقات شیلات ایران. پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان
- زرشناس، غلامعباس، ۱۳۷۷ . بررسی تولید مثل و تغذیه طبیعی میگوی سفید هندی(*Penaeus indicus*)در منطقه جاسک. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس.
- صفایی، م، ۱۳۸۰ . معرفی گونه های مختلف میگو در آبهای استان هرمزگان. موسسه تحقیقات شیلات ایران. مرکز تحقیقات شیلاتی دریای عمان.
- صفایی، م.، ۱۳۹۱. پویایی شناسی جمعیت میگوهای غالب در منطقه شمال غربی جزیره قشم. مجله علمی شیلات ایران، ۲۱(۳): ۸۵-۹۸.
- صفری ، م ، ۱۳۸۵ . بررسی ساختار جمعیت ماهی شیپ (*A. nudiventris*) دریای خزر با استفاده از روش ماکروساتلایت. پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات . دانشگاه منابع طبیعی گرگان. ۱۰۸ ص.
- قرایی، ا.، غفاری، م.، ۱۳۹۰. کاربرد ژنتیک مولکولی در مطالعات آبزیان. سازمان انتشارات جهاد دانشگاهی، (۱) ۳۷: ۲۲-۳۷.
- کامرانی ،الف و خضرایی نیا ۱۳۷۳ . تجزیه و تحلیل ساختار جمعیتی و وضعیت صید میگوهای غالب استان هرمزگان در سال ۱۳۷۳ . موسسه تحقیقات شیلات ایران. مرکز تحقیقات شیلاتی دریای عمان.

- کامرانی، الف، ۱۳۷۴ . تجزیه و تحلیل ساختار جمعیتی و وضعیت صید میگوهای غالب استان هرمزگان در سال ۱۳۷۴ . موسسه تحقیقات شیلات ایران. مرکز تحقیقات شیلاتی دریای عمان.
- کامرانی، الف، ۱۳۷۵ . تجزیه و تحلیل ساختار جمعیتی و وضعیت صید میگوهای غالب استان هرمزگان در سال ۱۳۷۵ . موسسه تحقیقات شیلات ایران. مرکز تحقیقات شیلاتی دریای عمان.
- کشاورزی، ف.، ۱۳۹۲. بررسی تنوع ژنتیکی میگوی موزی *Fenneropenaeus merguiensis* در خوریات لافت و سیریک با استفاده از توالی یابی ژن 16SrRNA میتوکندریایی. پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه هرمزگان، ۷۶ صفحه.
- مسندانی، س، ۱۳۷۵ . بررسی ضریب تبدیل غذایی (f.cr) میگوی سفید هندی(*Penaeus indicus*). پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه منابع طبیعی تهران.
- مومنی ،م ، دقوقی،ب، درویشی،م،پهپوری،ع،خواجه نوری،ک،صفایی،م، صادقی ، م ،غریب نیا ، م ،کرمی،ن ، بارانی،م ،مقصودی ، ع ، قلیینی ،ا ، ۱۳۸۹. بررسی مسیر حرکت و محاسبه میزان رشد میگوی موزی (P.merguiensis) رها سازی شده در آبهای خلیج فارس و دریای عمان (استان هرمزگان) . موسسه تحقیقات شیلات ایران ، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان . ۱۰۸ ص
- مومنی ،م ،سالاری پوری ، ع ،بهزادی ، س ، درویشی، م ،خواجه نوری، ک،محبی، پ، ،کرمی، ن ، بارانی،م ۱۳۹۴ . بررسی وضعیت ذخایر میگو در آبهای هرمزگان. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان . ۹۸ ص
- نوروزی ، م ، ۱۳۸۶ . بررسی ساختار جمعیتهای ماهی ازون برون (*Acipenser steilatus*) دریای خزر با استفاده از روش ملکولی میکروساتلایت. رساله دکتری رشته بیولوژی دریا . دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات۱۶۹ ص.
- وحیدی نژاد، س.، ۱۳۹۲. بررسی تنوع ژنتیکی مایسید در برخی استخرهای پرورش میگوی استان های هرمزگان و سیستان و بلوچستان با استفاده از توالی یابی ژن 16SrRNA میتوکندریایی. پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه هرمزگان، ۷۴ صفحه

– Alexeyev, M. F., Ledoux, S. P. and Wils, G. L. 2004. Mitochondrial DNA and aging. *Clinical Science,* 107: 355-364.
– Allen, P. J., Amos, W., Pomeroy, P. P. and Twiss, S. D. 1995. Microsatellite variation in grey seals (*Halichoerus grypus*) shows evidence of genetic differentiation between two British breeding colonies. *Molecular Ecology,* 4: 653-662.
– Baldwin, J. D., Bass A. L., Bowen, B. W. and Clark, W. C. 1998. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp Penaeus. *Molecular Phylogenetics and Evolution,* 10: 399-407.

- Berrebi, P., 1995. Speciation of the Genus barbus in the north Mediterranean basin: recent advances from biochemical genetics. *Biological conservation*, 72:237-249.
- Billington, N., Hebert, P.D.N. 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Can. J. Fish and Aquat. Sci*., 48:80-94.
- Bonnauld, L., Boucher-Rodoni, R., Monnerot, M., 1994. Phylogeny of decapod cephalopods based on partial 16SrDNA nucleotide sequences. C. R. de l'Acad. Sci., Paris, *Sciences de la vie/ Life Sci*., 317:575-580.
- Brown, W.M. 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. Pp. 62-88 *in* M. NEI and R. K. KOEHN, eds. Evolution of genes and proteins. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Brown, R.P., Terrasa, B., Pérez-Mellado, V., Castro, J.A., Hoskisson, P.A., Picornell, A., Ramon, M.M. 2008 . Bayesian estimation of post-Messinian divergence times in BalearicIsland lizards. *Molecular Phylogenetics*, 48:350-358.
- Bruford, M., Bradley, D., Luikart, G. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nat. Rev. *Genet.*, 3:900-910.
- Biagi, P. and Nisbet, R. 2006. The prehistoric fisher-gatherers of the western coast of the Arabian Sea: A case of seasonal sedentarization, *World Archaeology,* 38: 220-238.
- Bruford, M.w., Cheesman, D.J., Coote, T., Green, H.A.A., Haines, S.A. and Oryan, C. 1996. Microsattelite and their application to conservation genetics. In Smith, T.B.,Wayne, R.K. (Eds.), Molecular Genetic approaches in conservation. Oxford University press, Oxford, PP. 278- 297
- Cattaneo, C Cognetti, G., Maltagliati, F. 2004. Strategies of genetic biodiversity conservation in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 48:811-812.
- Diz, P.A., Presa, P. 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilusalloprovincial*s in Galician Rías (NW Iberian estuaries). *Aquaculture*, 287:278-285.
- Dunham, R.A. 2004. Aquaculture and fisheries biotechnology Genetic Approaches. CABI Publishing, University of Auburn. Cambridge, MA 02139.385P.
- FAO,2000. Fisheries Department, Fisheries Information, Data and Statistic Unit, FISHSTAT Plus database, Version 2.3.
- FAO, 1985. Food and Agriculture Organization.
- Gai, Y.H., Song, D.X., Sun, H.Y., Zhou, K.Y. 2008. The complete mitochondrial genome of symphylella sp. (Myriapoda: Symphyla): Extensive gene order rearrangement and evidence in favor of progoneata. *Mol. Phylogent. Evol.*, 49:547-585.
- Garcia, S., Reset, L.L. 1981. Life cycles, dynamics, exploitation and management of coastal penaeid shrimp stock. FAO Fishery Technical Report, 203, 0215.
- Guven, S., Yilmaz, E., kutby, H., Sariyildiz, S., Dalar, S., Poluman, A.2004. The Diagnostic Value of Polymerase chain Reaction (PCR) in Bronchialveolveolar Lavage. *Eastern Journal of Medicine*, 9(1):7-12.
- Garcia, D. K., Faggart, M. A, Rhoades, L., Alcivar-Waren, A., Wyban, J. A., Carr, W. H., Sweeney, J. N. and Ebert, K. M. 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetics techniques. *Molecular Biology and Biotechnology,* 3(5): 270-280.
- Hara, M. and Sekino, M. 2003. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture,* 217: 107-114.
- Holthuis, L. B. 1980. FAO species catalog, shrimp and prawns of the word. Rome, Itally.125 (1): 127P.
- Hillis, D.M., Moritz, C. 1990. Molcular taxonomi.Sinauer associate, Inc. Publishers. Massachusetts.
- Limits of Oceans and Seas 1953. 3rd edition International Hydrographic Organization. Retrieved 7 February 2010. Available from: http://www.iho -ohi.net/iho_pubs/standard/S-23/S23_1953.pdf
- Jackson, J. C., Rothlisberg, P. C. and Pendrey, R. C. 2001. Role of Larval distribution and abundance in overall life-history dynamics, *Marine Ecology Progress Series,* 213: 241-252.
- Khamnamtong, B., Klinbunga, S., Menasveta, P. 2009. Genetic Diversity and Geographic Differentiation of the Gaint Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand Analyzed by mithochondrial COI sequencs. *Biochem Genet*., 47:42-55.
- Kong, X.Y., Li, Y.L., Shi, W., Kong, J.2010. Genetic variation and evolutionary demography of *Fenneropenaeus chinensis* populations, as revealed by the analysis of mitochondrial control region sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 33(2):379-389.
- Kai, Y., Nakayama, K. and Nakabo, T. 2002. Genetic differences among three colour morphotypes of the black rockfish, *Sebastes inermis*, inferred from mtDNA and AFLP analyses. *Molecular Ecology,* 11(2): 591-2598.

- Khan G. and Latif, M.A. 1995. Potentials, constructions and strategies for conservation and management of open brackish water and marine fishery resources, Fisheries and Aquaculture department. National Workshop on Fisheries Resources Development and Management in Bangladesh - Bay of Bengal Programme**,** Project reports.
- Khorshidian, K. 2000. Moghayeseh faaleiathay -e- sayyadi -e- shenavarhaye ostan Bushehr (Comparative study of fishing fleet in Bushehr province), Final Project, Persian Gulf Fisheries Research Centre- P.O. Box 1374 -Bushehr- Iran.
- Khorshidian, K. 2002. Biological characteristics of commercially exploited penaeidae shrimp (*Penaeus semisulcatus*) in the north-western part of the Persian Gulf, Final Project, The United Nations University, PO Box 1390, Skulagata 4 120 Reykjavik, Iceland.
- Kucuktas, H. and Liu, Z. 2007. Allozyme and mitochondrial markers, Aquaculture Genome Technologies, edited by Z Liu. Blackwell Publishing, Ames, IA, pp. 73-85.
- Lester, L. J. and Pante, M. J. R. 1992. Genetics of *Penaeus species*. In: *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices,* (eds. Fast, A. W. and Lester, L. J.). Amsterdam, Netherlands: *Elsevier SciencePublishers*, pp. 29-52
- Lester, L.J., Pante, M.J.R.1992. Genetics of *Penaeus* species. In. Marine shrimp culture: Principles and practices. ArIo, W., Fast and L. James Lester, (editor). Elsevier science publishers, 29-52.
- Li, Y.L., Kong, X.Y., Yu, Z.N., Kong, J., Ma, S., Chen, L.M. 2009. Genetic diversity and historical demography of Chinese shrimp *feneropenaeus chinensis* in Yello Sea and Bohai Sea based on mithochondrial DNA analysis. *African Journal Biotechnology*, 8(7):1193-1202.
- Liu., Z., Tan, G., Li, P. and Dunham, R.A. 1999. Transcribed di nucleotide microsatellites and their associated genes from channel catfish *Ictalurus punctatus.Biophysical Research Communication*. 259: 190- 194.
- Liu, Z. J., Li, P., Kocabas, A., Ju, Z., Karsi, A., Cao, D. and Patterson, A. 2001. Microsatellite-containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochemical and Biophysical Research,* 289: 317-324.
- Liu, Z. J. and Cordes, J. F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture,* 238: 1-37.
- Maggioni, R., Rogers, A. D. and Maclean, N. 2003. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. *Molecular Ecology,* 12: 3213-3217.
- May B. 2003. Allozyme variation. In: Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists, edited by EM Hallerman. *American Fisheries Society,* Bethesda, MD, pp. 23-36.
- Maxam, A.M., Gilbert, W. 1977. A new method for sequencing DNA". Proc. Natl**.** Acad. Sci. U.S.A., 74(2):560-564.
- May, B., Krueger, C.C., Kincaid, H.L.1997. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in Acipenser and Scaphirhynchus. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences,* 54:1542-1547.
- Mullis KB. 1986. "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol*. vol. 51 pp. 263–73
- Naderi, S., Rezaei, H.R., Taberlet, P., Zundel, S., Rafat, S.A., Naghash, H.R., Elbarody, M.A.A., Ertugrul, O., Pompanon, F. 2007: Large-scale mitochondrial DNA analysis of the domestic goat reveals six haplogroups with high diversity. *PLoS ONE*, 2:10, e1012.
- Niamaimandi, N. 2006. Bio-Dynamics and Life Cycle of Shrimp (*Penaeus semisulcatus*), in Bushehr Coastal Waters of the Persian Gulf. PhD thesis, Universiti Putra Malaysia.
- Page, R.D.M., Holmes, E.C. 1998. Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Parker, P. G., Snow, A. A., Schug, M. D., Booton, G. C. and Fuerst, P. A. 1998. What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79: 361- 382.
- Rezvani Gilkolaei1, S., Kavan, S. L. and Safari, R. 2012. A Study of Genetic Structure of Rutilus frisii kutum in Anzali Lagoon, using Microsatellite markers. *Journal of Agriculture Science and Techonoly*. 14: 327-337.
- Sanger, F., Coulson, A.R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase". *J. Mol. Biol*., 94(3):441-448.
- Shaw, P.W., Turan, C., Wright, J.M., O'connell, M., Carvalho, G.R.1999. Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*), with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analysis. *Heredity*, 83:490-499.

- Stepien, C.A., Kocher, T.D.1997. Molecules and morphology in studies of fish evolution. In: Molecular Systematics of Fishes (eds Kocher TD, Stepien CA), 1-12. Academic Press, San Diego, CA
- SFC (Safe Food Commerce) Interbational Ltd. Omega 4 No. 116 Roach Road .London E3, 2PA, United Kingdom. Available from: http:// www.sfc-int.com
- Taggart, J. B., hynes, R. A., Prodohal, P. A. and Ferguson, A. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of Fish Biology,* 40: 963-965.
- Tamadoni Jahromi., S. and Othman., A.S. 2011. Isolation and characterization of novel microsatellite loci in Green Tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus*). *International Journal of Life Science and Pharma Research* , 1:121-125
- Tam, Y. K. and Kornfield, I. 1996. Characterization of microsatellite markers in *Homarus* (Crustacea, Decapoda). *Molecular Marine Biology and Biotechnology,* 5: 230-8.
- Tassanakajon, A., Tiptawonnukul, A., Supungul, P., Rimphanitchayakit, V., Cook, D., Jarayabhand, P., Klinbunga, S. and Boonsaeng, V. 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology,* 7: 55-61.
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 Nucleic Acids Research. 35: W71–W74. doi:10.1093/nar/gkm3 View Article PubMed. NCBI Google Scholar.
- Tjensvoll, K., Heikkilä, R., Oltedal, S., Gilje, B., Oddmund, N . 2008. High-Fidelity DNA Polymerase Enhances the Sensitivity of a Peptide Nucleic Acid Clamp PCR Assay for K-ras Mutations. *Molecular Diagnostics*, 10:325-331
- Wallace RB, Shaffer J, Murphy R, Bonner J, Hirose T, Itakura K 1979. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to ΦX 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic acids research*; 6(11):3543-3558
- Wanna, W., Rolland, J.L., Boahomme, F., Phongdara, A. 2004. Population genetic structure of Penaeus merguiensis in Thailand based on nuclear DNA variation. *Journal of Experimental Marine Biology*, 311:63-78.
- Weersing K. and Toonen R. J. 2009. Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series,* 393: 1-12.
- Weersing, K., Toonen, R.J. 2009. Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series*, 393:1-12.
- Wright, S. 1978. Evolution and Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations. The University of Chicago Press, Chicago.
- Xu, Z., Primavera, J. H., Leobert, D., Pena d. l., Pettit, P., Belak J. and Alcivar-Warren, A. 2001. Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture,* 199: 13-40.

Abstract

Genetic knowledge and Gene bank preparation can help to protect biodiversity and detect , species identify , fishing offenses , genetic classification and also identification the faliure cross hybridizations of marine animals .

In this study, sampling was performed from Jask, guatr and Hormuz areas, which is the most important habitats for the species studied using bottom trawl. Total DNA extraction was performed using phenol - chloroform method. After relevant studies on this gene primers were designed and in use. After editing the sequences, nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) was performed using NCBI blast main page.

The sequences obtained from each sample were aligned and corrected from any ambiguities and assembled using Bio edit program .Trees were generated using maximum parsimony (MP), a character-based algorithm and neighbor joining (NJ) a distance-based algorithm for phenetic analysis. The distance matrix option of MEGA4 was used to calculate genetic distance according to the Kimura 2-parameter model of sequence evolution.

Based on the results obtained, the optical density of 260 to 280 nm in the samples was recorded between 1/8 - 2, indicating good quality DNA samples.

Optimized PCR reaction to 16SrRNA and COI gene amplification using the gradient between 48 - 60° C showed that the most suitable criteria for binding primers, 48 and 54 Celsius degrees respectively.

The project objectives including the identification of the genetic structure of the species, and draw the phylogenetic trees using two genes 16SrRNA and COI, making identification and registration of specified computer storage and regulate the structure and management of mentioned species by focus on genetic resources 5 species of shrimp (*P. semisulcatus* ،*P. indicus*، *P. merguiensis* ،*P. monodon*،*M. affinis*) in the Persia Gulf and Oman Sea through the creation of an integrated network of aquatic genetic resources in the region to try to identify genetic resources and aquatic gene bank.

Molecular investigation of mitochondria DNA (mtDNA) using partial sequences of 16S rRNA gene showed relatively low genetic differences between the *P. semisulcatus* morphotypes. These sequences were able to distinguish between the two morphotypes, and separated them into two distinct clades. Also genetic divergence detected by COI gene analysis was consistently higher. High genetic divergence for COI was observed between the two morphotypes of *P.semeisulcatus* which emphesise that the gene bank preparation should be perform for this morphotype of this species.

This type of analysis could be considered as an important tool to be used in broodstock selection in breeding programs. In this case, different management in broodstocking programs should be performed for two morphotypes of P. *semisulcatus* which were detected in Persian Gulf. The results of this study show that two Morphotype of *P.semisulcatus* can be considered as two separate species from genetic aspects.

In this regard, it can be assumed that the genetic composition of the studied species is very close together and we've no seen a huge difference in the species except in the green tiger species.

Keywords: Gene Bank, mtDNA ، Genetic Resourcess ،16S rRNA, Cytochrom Oxidase I, *P. semisulcatus*،*P. indicus*، *P. merguiensis* ،*P. monodon*،*M. affinis*

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center

---

Project Title : Gene bank preparation from the endemic shrimps and crustaceans of Persian Gulf and Oman Sea
Approved Number: 014-75-12-8919-91001
Author: Saeid Tamadoni Jahromi
Author province(S):Armin Abedian (Off-Shore Fisheries Research Center-Chabahar) Aghil Dashtian nasab (Shrimp Research Center) - Jasem Ghafleh marmazi(Aquaculture Research Center- South of Iran)
Project Researcher : Saeid Tamadoni Jahromi
Collaborator(s) *:* A. Ghoroghi, S. Rezvali Gilkolaei, M.R. Sadeghi, T. Valinasab, M. Basirat, , S. Samadi, M. Mohmmadiha, E. Maghsodloo
Advisor(s): -
Supervisor: M. Pourkazemi
Location of execution : Hormozgan province
Date of Beginning :2012
Period of execution : 3 Years & 9 Months
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2016

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

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute - Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center

Project Title :

Gene bank preparation from the endemic shrimps and crustaceans of Persian Gulf and Oman Sea

Project Researcher :

Saeid Tamadoni Jahromi

Register NO.

49723