

بررسی مقدماتی فیلوژنی و ساختار ژنتیکی میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) در خوریات لافت و سیریک خلیج فارس با استفاده از توالی یابی ژن میتوکندریایی 16S rRNA

ایمان سوری نژاد^{۱*}، فریا کشاورزی^۱، سعید تمدنی جهرمی^۲ و سمیرا وحیدی نژاد^۱
^۱ گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
^۲ بخش ژنتیک، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، هرمزگان، بندرعباس، ایران

چکیده

میگوی موزی با نام علمی *Fenneropenaeus merguensis* از مهم ترین گونه های میگو در خلیج فارس است که حدود ۶۰ درصد از صید میگوی استان هرمزگان را تشکیل می دهد. با توجه به اهمیت این گونه در چرخه صید و صیادی، فیلوژنی و ساختار ژنتیکی جمعیت این گونه در خوریات لافت و سیریک خلیج فارس با روش توالی یابی ژن میتوکندریایی 16S rRNA بررسی شد. نتایج توالی یابی ژن 16S rRNA ۱۰ میگوی نمونه برداری شده که شامل ۴۴۸ باز هم ردیف شده بود، یک جایگاه ژنی مونومورف، ۴۴۷ جایگاه ژنی پلی مورف و ۷ هاپلو تیپ نشان داد. هیچ گونه چند شکلی اضافه و حذف مشاهده نشد. مقدار F-statistic در سطح اطمینان ۹۵ درصد بین دو جمعیت میگوی خوریات لافت و سیریک (برابر با ۰/۱۴) معنی دار نبود (P value = ۰/۰۸). ترسیم درخت های تکاملی ساختار جغرافیایی مشخصی را بین دو منطقه نشان نداد. میانگین مقدار آزمون تاجیما و Fu's FS بین دو جمعیت (به ترتیب برابر با ۲/۶۱ و ۱۰/۳۳) معنی دار نبود که مؤید عدم بسط جمعیتی بین نمونه های دو منطقه است. میزان تنوع هاپلو تیپی و نوکلئوتیدی نمونه های دو منطقه به ترتیب 0.004 ± 0.933 و 0.802 ± 0.672 محاسبه شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که *F. merguensis* در خوریات لافت و سیریک از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است اما با توجه به میزان شاخص جدایی جمعیت و حد معنی دار بودن، نمی توان با یقین جمعیت ها را یکی دانست. نتایج تحقیق حاضر می تواند در مدیریت شیلاتی مبتنی بر بازسازی ذخایر و حفظ تنوع ژنتیکی هر یک از جمعیت ها مدنظر قرار گیرد.

واژه های کلیدی: فیلوژنی، خلیج فارس، خوریات لافت و سیریک، میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) 16S rRNA

مقدمه

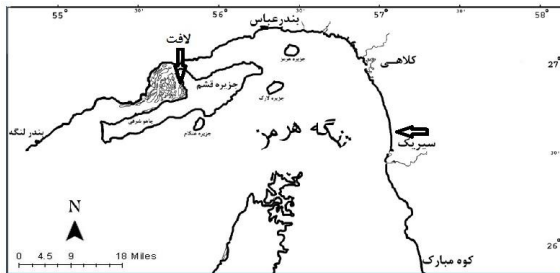
بررسی روند تکاملی و ساختار ژنتیکی جمعیت های مختلف آبزبان به منظور اعمال مدیریت شیلاتی و بهره برداری پایدار از ذخایر اهمیت ویژه ای دارد (Lin Thai et al., 2002؛ Thorrold et al., 2002؛ et al., 2006). همچنین ارزیابی روند تکاملی اطلاعات ارزشمندی را در راستای طبقه بندی و مطالعه ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت ها در اختیار پژوهشگران قرار می دهد (Benzie et al., 1995؛ Ghasabshiran et al., 2013). این اطلاعات برای حفاظت از گونه های در معرض تهدید و در صنعت آبی پروری مفید است (Mohamadian et al., 2006؛ Valles-Jimenez et al., 2010؛ Vera et al., 2010؛ Rezaei et al., 2010؛ et al., 2011).

خانواده Penaeidae شامل گروه متنوعی از گونه های میگو است که در خورها و مصب ها و محیط های دریایی مناطق استوایی و نیمه استوایی در سراسر جهان یافت می شوند (Gulland and Rothschild, 1984). میگوهای این خانواده از لحاظ صید و صیادی ارزشمند هستند و در وسیعی نیز به طور پرورشی تکثیر می شوند (Leung and Engle, 2006). اهمیت اکولوژیکی و اقتصادی میگوهای خانواده Penaeidae به اجرای تحقیقات زیست شناختی و ژنتیکی گسترده ای درباره گونه ها و جمعیت های آن منجر شده است. با توجه به پراکنش بسیار گسترده میگوهای این خانواده در منابع آبی جهان، نتایج تحقیقات ژنتیکی محققان از عدم تعیین ساختار ژنتیکی و جمعیتی مشخص در برخی مطالعات (Benzie, 2000؛ Cui et al., 2007) تا تعیین ساختار ژنتیکی و جمعیتی مشخص و معنی دار در مطالعات دیگر متغیر

است (You et al., 2008؛ Klinbunga et al., 1999). به طور کلی، بسیاری از بی مهرگان آبی در مراحل لاروی و روند تکاملی خود دارای بسترهای مشترکی هستند که این عامل سبب مهاجرت بین مناطق و ایجاد جریان ژنی بین آنها می گردد (Avisé, 2000). به همین علت بررسی های مولکولی جدایی جغرافیایی اندکی را در این گونه ها که از پتانسیل پراکنندگی بالایی برخوردارند، نشان می دهد (Palumbi, 2003) هر چند که اخیراً گزارش هایی مبنی بر جدایی جمعیتی گونه هایی که در فاصله جغرافیایی کم زیست می کنند گزارش شده است (Hellberg, 2009).

پراکنش عمده خانواده Penaeidae به ویژه جنس های *Penaeus* و *Fenneropenaeus* در جنوب شرقی آسیا، هند، خلیج مکزیک، استرالیا و خلیج فارس است. در میان گونه های خانواده Penaeidae، میگوی موزی (*F. merguensis*) یکی از هشت گونه اقتصادی مهم این خانواده است (Leung and Engle, 2006). *F. merguensis* از مهم ترین گونه های میگو در صیدگاه های استان هرمزگان است که حدود ۶۰ درصد از کل صید میگو در این استان را تشکیل می دهد. ذخایر میگو نه تنها به خاطر ارزش غذایی و میزان ارزآوری نقش به سزایی در اقتصاد کشور ایران دارد، بلکه در صنعت تکثیر و پرورش نیز از جایگاه خاصی برخوردار بوده، یکی از محورهای اصلی توسعه در بخش شیلات جنوب کشور را به خود اختصاص داده است. هر ساله بهره برداری از ذخایر میگوی *F. merguensis* در صیدگاه های استان هرمزگان توسط تعداد زیادی از شناورهای سنتی و تا حدودی شناورهای صنعتی به منظور تأمین نیاز بازار مصرف و همچنین تأمین میگوی مولد و صادرات آن به خارج از کشور انجام می شود.

تصادفی از دو منطقه لاف و سیریک (هر منطقه پنج نمونه) استان هرمزگان در خرداد ماه ۱۳۹۲ صید شد (شکل ۱) و پس از تثبیت در الکل ۹۶ درصد به آزمایشگاه ژنتیک پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان انتقال یافت.



شکل ۱- دو منطقه نمونه برداری از میگوی *F. merguensis* در خوریا لاف و سیریک در استان هرمزگان

استخراج DNA با اندک تغییری با روش فنل-کلروفرم (Taggart *et al.*, 1992) از بافت ماهیچه‌ای پاهای شای میگو انجام گرفت و کیفیت آن با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد ارزیابی شد (Palumbi *et al.*, 1991).

برای تعیین تنوع ژنتیکی در میگوی *F. merguensis* از روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA استفاده شد. بدین منظور، ژن 16S rRNA با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با یک جفت آغازگر ژن 16S rRNA متعلق به خانواده Penaidae به شرح ذیل تکثیر شد (Palumbi *et al.*, 1991):

(Forward, 16Sar5') 5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'
(Reverse, 16Sbr3') 5'-CCG GTY TGA ACT CAG ATC AYG T-3'

هر ویال از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک میکرولیتر DNA حدوداً ۱۰۰ نانوگرم، ۵ میکرولیتر PCR Buffer (10X)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰

در سال‌های اخیر DNA میتوکندریایی به طور گسترده به عنوان نشانگر ژنتیکی در گونه‌های مختلف میگوهای خانواده Penaeidae استفاده شده است. استفاده از این نشانگر به دلیل دارا بودن بسیاری از ویژگی‌های مطلوب نظیر عدم نوترکیبی، وراثت از طریق مادری و نرخ بالای جهش در مطالعات ساختار ژنتیکی و روند تکاملی مناسب تشخیص داده شده است (Klinbunga *et al.*, 2001; Garcia-Machado *et al.*, 2001). ژن 16S rRNA یکی از نواحی بسیار متغیر در ژنوم میتوکندریایی است که سرعت پایین تکاملی از خود نشان می‌دهد و برای مطالعه تمایز بین گونه‌ها، تعیین رابطه تبارشناسی ژنتیکی و تفکیک جمعیتی تا حد خانواده یا جنس با استفاده از تکنیک توالی‌یابی مفید است (Aliabadian *et al.*, 2009; Calo-Mata *et al.*, 2008; Ketmaier *et al.*, 2008).

با وجود اهمیت اقتصادی و بوم‌شناختی میگوی *F. merguensis* در خلیج فارس و دریای عمان اطلاعاتی در زمینه روند تکاملی و ساختار ژنتیکی و همچنین تفکیک گونه‌ای جمعیت‌های آن در دسترس نیست. هدف از پژوهش حاضر، بررسی ساختار ژنتیکی و تکاملی میگوی *F. merguensis* در دو منطقه لاف و سیریک استان هرمزگان و تعیین قرابت یا جدایی ژنتیکی احتمالی جمعیت‌های آن در این دو منطقه به منظور آرایه به مسئولان اجرایی شیلاتی در جهت حفظ خزانه ژنی، اجرای برنامه‌های بازسازی ذخایر و بهره‌برداری بهینه از جمعیت‌های آن در این مناطق است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۰ قطعه میگوی *F. merguensis* به طور

شد.

پس از تعیین توالی‌ها، بازنگری توالی‌های مشابه با نرم‌افزار Chromas نسخه ۲/۲۳ انجام شد. برای شناسایی اختلاف میان توالی‌ها، نمونه‌های توالی‌یابی شده با نرم‌افزار Clustal W (Thompson *et al.*, 1997) هم‌ردیف شدند. شاخص‌های تنوع مولکولی نظیر تعداد هاپلو تیپ‌ها، مکان‌های چندشکلی، تنوع هاپلو تیپی و نوکلئوتیدی به همراه واریانس بر اساس مدل Nei (1978)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، واگرایی ژنتیکی (F_{ST}) که نشانه جدایی جمعیت‌ها است به صورت جفتی بین مناطق نمونه‌برداری با ۱۰۰۰ تکرار (Slatkin and Hudson, 1991) توسط نرم‌افزار Arlequin نسخه ۳/۱ (Excoffier *et al.*, 1992) و نرم‌افزار DnaSp (Rozas *et al.*, 2003) محاسبه شد. گسترش و پراکنش جمعیتی با روش آزمون‌های بی‌طرفی (neutrality tests) شامل دو آزمون: Tajima's D (Tajima, 1989) و Fu's FS (Fu, 1997) با نرم‌افزار Arlequin نسخه ۳/۱ بررسی شد. درخت‌های فیلوژنتیکی با روش‌های UPGMA و Maximum Parsimony و ۱۰۰۰ تکرار توسط نرم‌افزار MEGA نسخه ۴ رسم گردید (Kimura, 1980).

میلی مولار، ۱ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ ماکرومول) و ۰/۴ میکرولیتر از آنزیم Taq-پلیمرز با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر (سیناژن، ایران) بود که با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر، (MJ research، مدل PTC-100، ساخت آمریکا) انجام شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر ژن مذکور با تنظیم دمای الحاق و بهینه‌سازی برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر مطابق جدول ۱ صورت گرفت.

۵ میکرولیتر از محصول PCR تمامی نمونه‌ها به همراه نشانگر مولکولی ۱۰۰ باز (شرکت Fermentas GmbH، ساخت آلمان) در ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد و پس از اطمینان از تکثیر اندازه مناسب ژن فوق، مقدار باقیمانده آنها پس از ارسال به بخش مولکولی شرکت ماکروژن (ساخت کره جنوبی)، خالص‌سازی و به عنوان DNA الگو برای توالی‌یابی استفاده شدند. واکنش‌های توالی‌یابی DNA به همراه آغازگر forward با بسته BigDye شرکت Applied Biosystems، ساخت آمریکا) با دستگاه DNA analyzer (مدل XL3730، شرکت Applied Biosystems، ساخت آمریکا) انجام

جدول ۱- برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن 16S rRNA

تعداد چرخه	زمان	دما (درجه سانتیگراد)	مراحل PCR
۱	۳ دقیقه	۹۵	واسرشت‌سازی اولیه
	۳۰ ثانیه	۹۵	واسرشت‌سازی
۳۰	۴۵ ثانیه	۴۸	الحاق
	۶۰ ثانیه	۷۲	بسط
۱	۵ دقیقه	۷۲	بسط نهایی

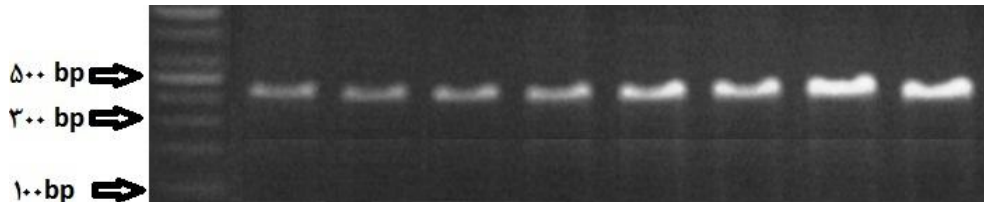
نتایج

با استفاده از شیب دمایی ۴۸-۶۰ درجه سانتیگراد نشان داد که مناسب‌ترین دما برای اتصال آغازگر، دمای ۴۸ درجه

بهینه‌سازی واکنش PCR برای تکثیر ژن 16S rRNA

باز را فراهم نمودند. الگوی بانندی محصول PCR روی ژل آگاروز یک درصد در شکل ۲ نشان داده شده است.

سانتیگراد است. آغازگرهای '16Sar5' و '16Sbr3' امکان تکثیر بخشی از ژن rRNA 6S به طول تقریبی ۴۷۰ جفت



شکل ۲- الگوی بانندی محصول PCR ژن 16S rRNA روی ژل آگاروز یک درصد

نداشتند ($P > 0.05$, $P \text{ value} = 0.08$).

در ترسیم درخت‌های تکاملی با روش UPGMA و Maximum Parsimony شاخه مجزایی از دو جمعیت مشاهده نشد و ساختار جغرافیایی مشخصی را بین دو منطقه نشان نداد (شکل‌های ۳ و ۴).

میانگین مقدار آزمون Tajima's D و Fu's FS برای ۱۰ توالی، به ترتیب ۲/۶۱ و ۱۰/۳۳ بین مناطق محاسبه شد. هر دو شاخص مثبت بود اما از لحاظ آماری معنی‌دار نبودند ($P > 0.05$, $P \text{ value} = 0.09$) (جدول ۳).

میزان تنوع هاپلو تیبی یا ژنی برای هر دو منطقه بالا بود (۰/۸۰۰ تا ۰/۹۰۰) و در خور لافت به میزان 0.164 ± 0.080 و در خور سیریک به میزان 0.161 ± 0.090 محاسبه شد. همچنین، تنوع نوکلئوتیدی درون جمعیتی برای ژن مورد بررسی در خور لافت به میزان 0.386 ± 0.637 ثبت شد. میزان تنوع هاپلو تیبی و تنوع نوکلئوتیدی برای تمامی نمونه‌ها (بین جمعیتی) به ترتیب: 0.04 ± 0.933 و 0.802 ± 0.672 محاسبه شد. میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای خور لافت 0.199 ± 0.594 و برای خور سیریک 0.196 ± 0.636 به دست آمد (جدول ۴).

بر اساس آنالیز انجام شده، تعداد ۷ هاپلو تیب در دو منطقه خور لافت و سیریک شناسایی شد. ۳ هاپلو تیب مربوط به نمونه‌های خور لافت و ۴ هاپلو تیب مربوط به نمونه‌های خور سیریک بودند. ۴ نمونه از نمونه‌های منطقه لافت دارای هاپلو تیب مشترک بودند (هاپلو تیب‌های شماره ۱ و ۲) و ۲ نمونه از نمونه‌های منطقه سیریک نیز دارای هاپلو تیب مشترک بودند (هاپلو تیب شماره ۴). هیچ هاپلو تیب مشترکی بین دو منطقه مطالعه شده به دست نیامد و تمامی هاپلو تیب‌ها منحصر به فرد بودند (جدول ۲).

از ۴۴۸ باز ردیف شده حاصل از ۱۰ نمونه توالی‌یابی شده ژن rRNA 16S در میگوی *F. merguensis* دو منطقه، یک جایگاه ژنی مونومورف، ۴۴۷ جایگاه ژنی پلی مورف و ۱۰۱۷ موتاسیون به دست آمد که نشان دهنده نرخ بسیار بالای موتاسیون در این گونه است. هیچ گونه چند شکلی اضافه و حذف (InDells) مشاهده نشد.

بر اساس محاسبه عامل F_{ST} بین نمونه‌های دو منطقه لافت و سیریک، فاصله جمعیتی بین دو منطقه ۰/۱۴ به دست آمد که در سطح احتمال ۰/۰۵ نمونه‌های دو منطقه مطالعه شده با فاصله کمی اختلاف معنی‌داری

جدول ۲- پراکنش هاپلوتیپی ژن 16S rRNA *F. merguensis* در دو منطقه خور لافت و سیریک

منطقه	هاپلوتیپ						
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
لافت	۲	۲	۱	-	-	-	۵
سیریک	-	-	-	۲	۱	۱	۵
جمع	۲	۲	۱	۲	۱	۱	۱۰

شاخص	خور لافت	خور سیریک
تعداد نمونه‌های بررسی شده	۵	۵
جایگاه‌های بررسی شده	۴۴۸	۴۴۸
تعداد جایگاه‌های چند شکلی	۴۲۴	۴۳۲
چند شکلی اضافه و حذف	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
تعداد هاپلوتیپ	۳	۴
تنوع نوکلئوتیدی	۰/۵۹۴ ± ۰/۳۶۰	۰/۶۳۷ ± ۰/۳۸۶
تنوع هاپلوتیپی	۰/۸۰۰ ± ۰/۱۶۴	۰/۹۰۰ ± ۰/۱۶۱
هتروزیگوسیتی مورد انتظار	۰/۵۹۴ ± ۰/۱۹۹	۰/۶۳۶ ± ۰/۱۹۶

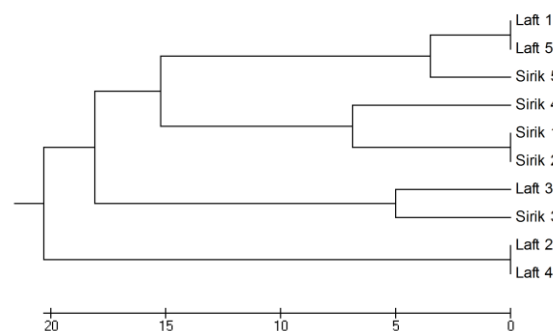
ترکیب نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA میگوی *F. merguensis* در جدول ۵ نشان داده شده است. مطالعه ترکیب نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA نشان داد که این توالی غنی از بازهای T و A (۶۸/۱۰ درصد) است.

جدول ۵- ترکیب نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA میگوی *F. merguensis* در دو خور لافت و سیریک (درصد)

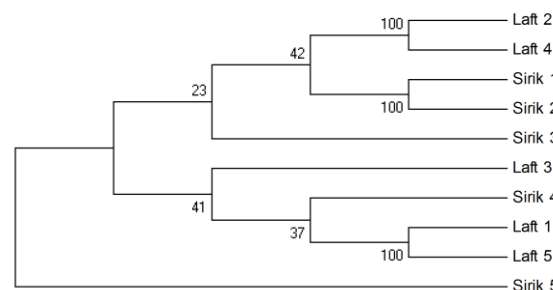
منطقه	C	T	A	G	جمع
خور لافت	۱۲/۲۸	۳۳/۶۲	۳۴/۴۶	۱۹/۶۴	۱۰۰
خور سیریک	۱۴/۳۷	۳۳/۵۳	۳۴/۶۰	۱۹/۶۰	۱۰۰

بحث

در دهه‌های اخیر با توسعه روش‌های نوین مولکولی تحقیقات در مورد ساختار ژنتیکی، جمعیتی و تکاملی گونه‌های مختلف آبزیان در اغلب کشورهای جهان انجام شده است و استفاده از نتایج آنها سبب اعمال مدیریت علمی و صحیح در راستای بازسازی ذخایر آبزیان، توسعه آبرزی‌پروری و حفظ ساختار ژنی جمعیت‌های مختلف شده است. تعیین ساختار ژنتیکی و جمعیتی گونه‌های مختلف آبزیان و برخورداری از تکنیک‌های سریع و نوین برای تعیین میزان قرابت خویشاوندی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای می‌تواند



شکل ۳- درخت تکاملی ژن 16S rRNA میگوی *F. merguensis* خوریات لافت و سیریک با روش UPGMA



شکل ۴- درخت تکاملی ژن 16S rRNA میگوی *F. merguensis* خوریات لافت و سیریک با روش Maximum Parsimony

جدول ۳- نتایج آزمون‌های Tajima's D و Fu's FS در میگوی *F. merguensis* دو خور لافت و سیریک

	Fu's FS		Tajima's D	
	FS	P value	D	P value
خور لافت	۱۲/۸۷	۱/۰۰	۲/۳۵	۰/۹۹
خور سیریک	۷/۷۸	۰/۹۹	۲/۸۶	۰/۹۸
میانگین	۱۰/۳۳	۰/۹۹	۲/۶۱	۰/۹۹

جدول ۴- شاخص‌های تنوع ژنتیکی *F. merguensis* در دو خور

فاصله جغرافیایی بین جمعیت‌ها تأثیر مهمی بر روند تکاملی، ساختار ژنتیکی و جریان ژنی دارد (Wang *et al.*, 2008). با افزایش فاصله جغرافیایی فاصله ژنتیکی افزایش می‌یابد که علت آن کاهش جریان ژنی در اثر وجود موانع فیزیکی یا طبیعی است (Beacham *et al.*, 2004؛ Mohamadian *et al.*, 2010؛ Rezaei *et al.*, 2010). یکی از علت‌های احتمالی عدم وجود تفکیک ژنتیکی جمعیت میگوی *F. merguensis* خوریات لافت و سیریک موقعیت جغرافیایی خور منطقه لافت است که به صورت یک مکان تقریباً بسته می‌تواند از میزان مهاجرت زیاد میگوی *F. merguensis* بین دو منطقه جلوگیری به عمل آورد. از آنجا که دو منطقه لافت و سیریک فاصله جغرافیایی چندانی ندارند بنابراین موضوع تأثیر فاصله جغرافیایی بر کاهش جریان ژنی منتفی به نظر می‌رسد. بنابراین، به دلیل فاصله نسبتاً نزدیک، تماس میان این دو جمعیت از طریق پدیده مهاجرت امکان‌پذیر است که این موضوع باعث برقراری میزان متوسط جریان ژنی و در نتیجه عدم تمایز بالای ژنتیکی جمعیت‌ها می‌شود (Cui *et al.*, 2007؛ Ghodsi *et al.*, 2011).

اصولاً اختلاف ژنتیکی بین جمعیت‌ها در نتیجه مجتمع شدن افراد در یک منطقه خاص به وجود می‌آید و جمعیت‌های یک گونه به واسطه آمیزش درونی با یکدیگر یک مخزن ژنی منحصر به همان جمعیت را ایجاد می‌کنند (Pinera *et al.*, 2007). به نظر می‌رسد در مورد جمعیت میگوی *F. merguensis* در خوریات لافت و سیریک جریان ژنی و مهاجرت بین جمعیت‌های این مناطق به وقوع پیوسته است اما با توجه به تنوع مولکولی مناسب، جمعیت دو منطقه هنوز به تعادل یا تفکیک جمعیتی کامل نرسیده باشند.

راهگشای بسیار خوبی برای استفاده مدیران اجرایی باشد، چرا که در بیشتر آبریان و به ویژه در سخت‌پوستان علی‌رغم وجود صفات ریخت‌شناسی یکسان تفاوت‌های ژنتیکی قابل توجهی در سطوح مختلف و در مناطق جغرافیایی متفاوت وجود دارد (Palumbi *et al.*, 1991).

از مهم‌ترین شاخص‌های تفکیک بین جمعیت‌ها، عامل F_{ST} است که نشان دهنده تمایز یا جدایی بین جمعیت‌هایی است که در مناطق مختلف جغرافیایی زیست می‌نمایند (Mohamadian *et al.*, 2010). در بررسی حاضر میزان F_{ST} با اطمینان ۹۵ درصد بین نمونه‌های دو منطقه ۰/۱۴ و غیر معنی‌دار محاسبه شد ($P > 0/05$). با توجه به این که مقدار عدد معنی‌داری (۰/۰۸) نزدیک به سطح احتمال ۰/۰۵ بود بنابراین نمی‌توان با قطعیت دو جمعیت میگوی *F. merguensis* در خوریات لافت و سیریک را یکی دانست.

نتایج حاصل از رسم درخت فیلوژنتیک برای نمونه‌های دو منطقه لافت و سیریک شاخه‌های مجزایی از دو جمعیت را نشان نداد و نتوانست تفکیک جغرافیایی نمونه‌های مختلف خوریات لافت و سیریک را نشان دهد. آزمون تفاوت بین جمعیت‌ها شامل Tajima's D و Fu's FS نیز غیر معنی‌دار به دست آمد و بنابراین فرضیه مستقل بودن جمعیت‌های میگوی *F. merguensis* دو منطقه لافت و سیریک رد می‌شود. بنابراین بر اساس این آزمون‌ها، میگوی *F. merguensis* در دو منطقه لافت و سیریک احتمالاً از جمعیت واحدی تشکیل شده‌اند و بسط و گسترده‌گی جمعیتی بین نمونه‌های دو منطقه وجود ندارد که وجود تنوع بالا درون مناطق نمونه‌برداری نیز این مسأله را تأیید می‌نماید.

عمیق تر دریا برای بلوغ جنسی و تولید مثل مهاجرت می کنند. سپس لاروهای پلاژیک تولید شده مجدداً به سمت این خوریات حرکت می کنند تا مراحل نوجوانی و پست لاروی را در این مناطق سپری نمایند. بنابراین، بین این خوریات رفتار مهاجرت و جریان ژنی تا حدودی برقرار است و درخت تکاملی ترسیم شده با روش UPGMA نیز توانست تفکیک جغرافیایی بین دو منطقه را نشان دهد. یکی از علت های اصلی وجود تفاوت های ژنتیکی در جمعیت های جانداران دریایی، توانایی گسترش و پراکندگی آنها است. بنابراین، در صورتی که یکی از مراحل زندگی موجودات دریایی حالت پلانکتونی داشته باشد، گسترش آنها ممکن است در فواصل مختلف اتفاق بیفتد. به بیان دیگر، وجود مرحله لاروی پلاژیک در میگوها از دلایل عمده انتشار و گسترش آنها در فواصل جغرافیایی مختلف و در نتیجه افزایش میزان جریان ژنی و عدم تمایز جمعیت ها است (Croos and Pálsson, 2010). دارا بودن مراحل پلانکتونی و لارو پلاژیک در آبزیان می تواند به جمعیت هایی با پراکندگی بالا و غیر متمایز از نظر ژنتیکی در مقایسه با گونه هایی با فقدان مراحل پلانکتونی منجر شود (Weersing and Toonen, 2009؛ Ghasabshiran et al., 2013).

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر در مورد تنوع و ساختار ژنتیکی میگوی *F. merguensis* به عنوان مهم ترین گونه صید میگو در استان هرمزگان نشان داد که تنوع هاپلو تپیی و نوکلوتیدی درون جمعیتی و بین جمعیتی بالایی بین خوریات لافت و سیریک در خلیج فارس وجود دارد. با توجه به آنالیز جمعیتی، یکی بودن جمعیت های میگوی *F. merguensis* در خوریات لافت و سیریک را نمی توان با یقین بالا عنوان نمود. در پژوهش حاضر، میزان تنوع هاپلو تپیی در درون

اصولاً پراکنش جغرافیایی میگوهای هر منطقه در ارتباط با شرایط زیست محیطی به ویژه میزان تحمل آنها نسبت به نوسانات شوری یا سایر عوامل مؤثر، شرایط بستر و وابستگی میگوها به آن، وجود مصب ها و خوریات و شرایط هیدرولوژیک آن و همچنین رفتارها و الگوهای مهاجرتی میگوها هم قرار دارد که بر میزان جریان ژنی تأثیر گذار است (Garcia and Le Reste, 1981؛ Croos and Pálsson, 2010). یکی از مهم ترین عواملی که می تواند در ساختار ژنتیکی، ترکیب یا عدم ترکیب جمعیت دو منطقه دخالت داشته باشند وجود سدهای فیزیکی یا گیاهی در مناطق مورد بررسی است (Ghelichpour et al., 2000؛ Tiedemann et al., 2010؛ Rezaei et al., 2010). در این ارتباط می توان به وجود خوریات و جنگل های حرا در هر دو منطقه اشاره داشت. جنگل های حرا یکی از مهم ترین مناطق نوزاد گاهی و تغذیه لارو ماهیان و سخت پوستان است. در دو منطقه لافت و سیریک وجود خور و مصب و همچنین پراکنش جنگل های حرا زیستگاه های متعدد مناسبی را از جهت فراهم بودن منابع غذایی و وجود پناهگاه برای مرحله نوزادی و پست لاروی میگوی *F. merguensis* فراهم می آورد. وجود تنوع مولکولی به دست آمده در میگوی *F. merguensis* در این دو منطقه می تواند در نتیجه این سدهای گیاهی و همچنین وجود تنوع زیستگاهی در خوریات و جنگل های حرا نیز باشد.

از دیگر عوامل مؤثر بر پراکنش میگوها، اندازه میگو است. در طول محور مهاجرت میگوها از خوریات و مصب ها به سمت آب های عمیق، به ترتیب میگوهای جوان در مناطق ساحلی و میگوهای بزرگتر در آب های عمیق تر مشاهده می شوند. با افزایش اندازه و سن، جمعیت های میگو از این خوریات به سمت مناطق

در طول رشد و پراکنش جمعیت منجر خواهد شد (Watterson, 1984؛ Bucklin and Wiebe, 1998). البته اندازه جمعیت مؤثر ممکن است بین نواحی مختلف جغرافیایی که پراکنش گونه جریان دارد به علت فرآیند پویایی جمعیت در طول تاریخ تغییر کند و در نتیجه سطوح تنوع ژنتیکی نیز دستخوش تغییراتی شود (Croos and Pálsson, 2010).

در یک جمع بندی کلی، رسم درخت فیلوژنی ساختار جغرافیایی مشخصی را در خصوص میگوی *F. merguensis* در خوریات لافت و سیریک استان هرمزگان نشان نداد. هر چند که بسط و گسترده‌گی جمعیتی مشاهده نشد اما بر اساس شاخص F_{ST} که نزدیک به حد معنی دار بود و نتیجه رسم درخت فیلوژنی، نمی توان به یقین یکی بودن جمعیت های دو منطقه را بیان نمود. همچنین بر اساس نتایج این تحقیق مشخص شد که ضروری است به منظور دستیابی به اطلاعات تکمیلی و انجام مطالعات گسترده تر جمعیتی از سایر ژن های میتو کندریایی یا ژنومی نیز استفاده شود. با توجه به این که پژوهش حاضر برای نخستین بار در کشور با ژن 16S rRNA و روش توالی یابی DNA در میگوی موزی انجام گردید، اطلاعات قابل توجهی به دست آمد که می تواند در جهت مدیریت و بهره برداری پایدار از ذخایر با ارزش این گونه در منابع آبی و نیز در صنعت آبرزی پروری کشور مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

نگارندگان از آقای مهندس چکمه دوز قاسمی کارشناس ارشد بخش ژنتیک پژوهشکده آبرزی پروری آب های داخلی، بندر انزلی به خاطر همکاری در تحلیل های آماری سپاسگزاری می نمایند.

نمونه های هر منطقه و نیز بین دو منطقه لافت و سیریک در حد بالایی بود. از ۱۰ توالی بررسی شده، تعداد ۷ هاپلو تیپ منحصر به فرد شناسایی گردید. تراز تنوع هاپلو تیپی می تواند از صفر (تمام افراد جمعیت دارای هاپلو تیپ یکسان) تا یک (تمام افراد جمعیت دارای هاپلو تیپ های متفاوت) متغیر باشد. میزان بالای تنوع هاپلو تیپی و تنوع نوکلئوتیدی درون و بین جمعیتی در میگوی *F. merguensis* مؤید تنوع ژنتیکی بالای این گونه میگو در دو منطقه نمونه برداری است.

تنوع هاپلو تیپی و نوکلئوتیدی مشاهده شده در تحقیق حاضر در محدوده نتایج به دست آمده از تنوع میتو کندریایی در گونه های میگوی بیری سیاه (*Penaeus monodon*) (Benzie et al., 2002)، میگوی سفید غربی (*P. vannamei*) (Valles- Jimenez et al., 2006)، میگوی *P. duorarum* (McMillen-Jackson and Bert, 2004)، میگوی *Litopenaeus setiferus* (McMillen-Jackson and Bert, 2003) و میگوی چینی (*P. chinensis*) (Kong et al., 2010) است که همگی سطوح بالای تنوع ژنتیکی را گزارش نمودند. در تناقض با نتایج تحقیق حاضر، تنوع هاپلو تیپی پایینی (۰/۲۴) در میگوی چینی در شمال غرب اقیانوس آرام گزارش شد (Cui et al., 2007). به طور کلی، میزان تنوع هاپلو تیپی بالا برای گونه های دریایی و به ویژه راسته ده پایان (Decapods) غیر معمول نیست (McMillen-Jackson and Bert 2004؛ Peijnenburg et al., 2004؛ Stamatis et al., 2004؛ Zardoya et al., 2004). این تنوع بالا اغلب به بزرگ بودن اندازه جمعیت در گونه های دریایی و پراکنده گی گسترده در فواصل زیاد نسبت داده می شود که به نگهداری بسیاری از هاپلو تیپ های منحصر به فرد

منابع

- Aliabadian, M., Alae Kakhky, N. and Darvish, J. (2012) Phylogenetic systematics of Barn Owl (*Tyto alba* (Scopoli, 1769)) complex inferred from mitochondrial rDNA (16S rRNA) taxonomic implication. *Taxonomy and Biosystematics* 4(11): 1-12 (in Persian).
- Avise, J. C. (2000) *Phylogeography, the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge.
- Beacham, T. D., Mcintosh, M. and MacConnachie, C. (2004) Population structure of lake-type and river-type sockeye salmon in Transboundary rivers of northern British Columbia. *Journal of Fish Biology* 65: 389-402.
- Benzie, J. A. H. (2000) Population genetic structure in Penaeid prawns. *Aquaculture Research* 31: 95-119.
- Benzie, J. A. H., Ballment, E., Forbes, A. T., Demetriades, N. T., Sugama, K., Haryanti, N. and Moria S. (2002) Mitochondrial DNA variation in Indo-Pacific populations of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Molecular Ecology* 11(12): 2553-2569.
- Benzie, J. A. H., Kenway, M., Ballment, E., Frusher, S. and Trott, L. (1995) Interspecific hybridization of the tiger prawns *Penaeus monodon* and *Penaeus esculentus*. *Aquaculture* 133: 103-111.
- Bucklin, A. and Wiebe, P. H. (1998) Low mitochondrial diversity and small effective population sizes on the copepods *Calanus finmarchicus* and *Nannocalanus minor*: possible impact of climate variation during recent glaciation. *Journal of Heredity* 89: 383-392.
- Calo-Mata, P., Pascoal, A., Fernandez, I., Bohme, K. and Gallardo, J. (2009) Evaluation of a novel 16S rRNA/tRNAVal mitochondrial marker for the identification and phylogenetic analysis of shrimp species belonging to the superfamily Penaeoidea. *Analytical Biochemistry* 391(2): 127-134.
- Croos, M. D. S. T. and Pálsson, S. (2010) Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of white shrimp *Fenneropenaeus indicus* along the coastal belt of Sri Lanka. *Aquatic Living Resources* 23: 315-323.
- Cui, Z. X., Li, C. P., Jang, I. K. and Chu, K. H. (2007) Lack of genetic differentiation in the shrimp *Penaeus chinensis* in the Northwestern Pacific. *Biochemical Genetics* 45: 579-588.
- Excoffier, L., Smouse, P. E. and Quattro, J. M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-49.
- Fu, Y. X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Garcia, S. and Le Reste, L. (1981) Life cycles, dynamics, exploitation and management of coastal Penaeid shrimp stock. *FAO Fisheries Technical Paper* 203: 1-215.
- Garcia-Machado, E., Robainas, A., Espinosa, G., Oliva, M., Paez, J., Verdecia, N. and Monnerot, M. (2001) Allozyme and mitochondrial DNA variation in Cuban populations of the shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea: Decapoda). *Marine Biology* 138: 701-707.
- Ghasabshiran, Z., Dorafshan, S. and Keivany, Y. (2013) Population genetic structure of Iranian cichlid, *Iranocichla hormuzensis* as an only cichlidae family in Iran using microsatellite markers. *Taxonomy and Biosystematics* 5(14): 9-16 (in Persian).
- Ghelichpour, M., Shabani, A. and Shabanpour, B. (2010) Genetic diversity of the two populations of Common carp (*Cyprinus carpio*) in Gharahsu and Anzali regions using eight microsatellite markers. *Taxonomy and Biosystematics* 2(5): 41-48 (in Persian).

- Ghodsi, Z., Shabani, A. and Shabanpour, B. (2011) Genetic diversity of *Liza aurata* (Risso, 1810) in the coastal regions of Golstan province, using microsatellite marker. *Taxonomy and Biosystematics* 3(6): 35-46 (in Persian).
- Gulland, J. A. and Rothschild, B. J. (1984) *Penaeid shrimps-their biology and management*. Fishing News Books, Farnham.
- Hellberg, M. E. (2009) Gene flow and Isolation among population of marine animals. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40: 291-310.
- Ketmaier, V., Bianco, P. G. and Drand, J. D. (2008) Molecular systematic, phylogeny and biogeography of roaches (Rutilus, Teleostei, Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 362-367.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Klinbunga, S., Penman, D. J., McAndrew, B. J. and Tassanakajon, A. (1999) Mitochondrial DNA diversity in three populations of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Marine Biotechnology* 1(2): 113-121.
- Klinbunga, S., Siludji, D., Wudthijinda, W., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. and Menasveta, P. (2001) Genetic heterogeneity of giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RADP and mitochondrial DNA RFLP analysis. *Marine Biotechnology* 3(5): 428-438.
- Kong, X. Y., Li, Y. L., Shi, W. and 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.
- Leung, P. and Engle, C. (2006) *Shrimp culture: economics, market, and trade*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Lin, Y. S., Poh, Y. P., Lin, S. M. and Tzeng, C. S. (2002) Molecular techniques to identify freshwater Eels. *Zoological Studies* 41(4): 421-430.
- McMillen-Jackson, A. L. and Bert, T. M. (2003) Disparate patterns of population genetic structure and population history in two sympatric penaeid shrimp species (*Farfantepenaeus aztecus* and *Litopenaeus setiferus*) in the eastern United States. *Molecular Ecology* 12: 2895-2905.
- McMillen-Jackson, A. L. and Bert, T. M. (2004) Genetic diversity in the mitochondrial DNA control region and population structure in the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*. *Journal of Crustacean Biology* 24: 101-109.
- Mohamadian, S., Rezvani Gilkolaei, S., Kazemian, M., Kamali, A., Taghavi, M. J., Rouholahi, S., Laloei, F. and Nayerani, M. (2010) The study of genetic diversity and population structure of *Vimba vimba persa* (Pallas, 1814) populations in the Eastern and Western coastline of the Caspian sea (Havigh River and GorganRoud River) using microsatellite markers. *Taxonomy and Biosystematics* 2(5): 29-38 (in Persian).
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Palumbi, S. R. (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications* 13: 146-158.
- Palumbi, S., Martin, R. A., Romano, S., McMillan, W. O., Stice, L. and Grabowski, G. (1991) *The simple fool's guide to PCR, version 2*. University of Hawaii, Honolulu.
- Peijnenburg, K. T. C., Breeuwer, J. A. J., Pierrot-Bults, A. C. and Menken, S. B. J. (2004) Phylogeography of the planktonic chaetogenath *Sagitta setosa* reveals isolation in European seas. *Evolution* 58: 1472-1487.

- Pinera, J. A., Blanco, G., Vázquez, E. and Sánchez, J. A. (2007) Genetic diversity of black spot seabream (*Pagellus bogaraveo*) populations Spanish Coasts: a preliminary study. *Marine Biology* 151: 2153-2158.
- Rezaei, M., Shabani, A., Shabanpour, B. and Kashiri, H. (2010) Genetic comparison of Caspian Sea *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) in Gorganroud and Cheshmekile (Tonekabon) rivers using microsatellite markers. *Taxonomy and Biosystematics* 2(1): 1-14 (in Persian).
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. and Rozas, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Slatkin, M. and Hudson, R. (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555-562.
- Stamatis, C., Triantafyllidis, A., Moutou, K. A. and Mamuris, Z. (2004) Mitochondrial DNA variation in Northeast Atlantic and Mediterranean populations of Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Molecular Ecology* 13(6): 1377-1390.
- 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.
- Tajima, F. (1989) Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Thai, B. T., Pham, T. A. and Austin, G. M. (2006) Genetic diversity of common carp in Vietnam using direct sequencing and SSCP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Aquaculture* 258: 228-240.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997) The CLUSTAL-X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research* 25: 4876-4882.
- Thorrold, S. R., Jones, G. F., Hellberg, M. E., Burton, R. S., Swearer, S. E., Niegel, J. E., Morgan, S. G. and Warner, R. R. (2002) Quantifying larval retention and connectivity in marine populations with artificial and natural markers. *Bulletin of Marine Science* 70: 291-308.
- Tiedemann, R., Hardy, O., Vekemans, X. and Milinkovitch, M. C. (2000) Higher impact of female than male migration on population structure in large mammals. *Molecular Ecology* 9(8): 1159-1163.
- Valles-Jimenez, R., Gaffney, P. M. and Perez-Enriquez, R. (2006) RFLP analysis of the mtDNA control region in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) populations from the eastern Pacific. *Marine Biology* 148: 867-873.
- Vera, M., Sourinejad, I., Bouza, C., Vilas, R., Pino-Querido, A., Kalbassi, M. R. and Martinez, P. (2011) Phylogeography, genetic structure, and conservation of the endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877), from Iran. *Hydrobiologia* 664: 51-67.
- Wang, H., Kesinger, J.W., Zhou, Q., Matrin, G. and Turner, S. (2008) Identification and characterization of zebra fish ocular formation genes. *Genome* 51(3): 222-235.
- Watterson, G. A. (1984) Lines of descent and the coalescent. *Theoretical Population Biology* 26: 77-93.
- Weersing, K. and Toonen, R. J. (2009) Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series* 393: 1-12.
- You, E. M., Chiu, T. S., Liu, K. F., Tassanakajon, A., Klinbunga S., Triwitayakorn, K., de La Pe, L. D., Li, Y. and Yu, H. T. (2008) Microsatellite and mitochondrial haplotype diversity reveals population differentiation in the tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Indo-Pacific region. *Animal Genetics* 39: 267-277.

Zardoya, R., Castilho, R., Grande, C., Favre-Krey, L., Caetano, S., Marcato, S., Krey, G. and Patarnello, T. (2004) Differential population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and the chub mackerel (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology* 13(7): 1785-1798.

**Primary study of phylogeny and genetic structure of
Banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*
in Laft and Sirik estuaries in the Persian Gulf
using mitochondrial 16S rRNA gene sequencing**

Iman Sourinejad ^{1*}, Fariba Keshavarzi ¹, Saeid Tamadoni Jahromi ² and Samira Vahidinejad ¹

¹ Department of Fisheries, Faculty of Marine and Atmospheric Science and Technology,
University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

² Department of Genetics, Persian Gulf and Oman Sea Research Center, Bandar Abbas, Iran

Abstract

Banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* is one of the most important shrimp species in the Persian Gulf comprising about 60% of total shrimp catch in Hormozgan Province. Regarding the importance of banana shrimp in fisheries industry, phylogeny and genetic structure of the population of this in Laft and Sirik estuaries in the Persian Gulf was investigated using mitochondrial 16S rRNA gene sequencing. Results of 16S rRNA gene sequencing of 10 shrimps including 448 aligned base pairs yielded one monomorphic locus, 447 polymorphic loci and seven haplotypes. No insertions and deletions were observed. F- statistic parameter at 95% level of confidence was 0.14 and was not significant between the two populations (P value= 0.08). Phylogenetic trees did not show a differentiated geographical structure between the two regions. Mean values of Tajima's D and Fu's Fs between the regions were 2.61 and 10.33, respectively. Insignificant values of these tests are indicative of no expansion of *F. merguensis* population between the two regions. Haplotype and nucleotide diversity of the shrimps were 0.933 ± 0.004 and 0.802 ± 0.672 , respectively for the two regions. The results of this study revealed that *F. merguensis* populations of Laft and Sirik estuaries had high levels of genetic diversity but regarding the value of F- statistic parameter and its significance level, the existence of genetically similar populations could not be deducted with high level of confidence. The results of present study could be considered in fisheries management for restocking programs and conservation of genetic diversity of populations.

Key words: Phylogeny, Persian Gulf, Laft and Sirik estuaries, Jinga shrimp, *Fenneropenaeus merguensis*, 16S rRNA

* sourinejad@hormozgan.ac.ir