فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال سوم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۴

تنوع ژنتیکی میگوی سرتیز *Metapenaeus affinis* در خلیج فارس بر اساس توالی ژن میتوکندریایی 16S rRNA

فاطمه شهرانی کرانی[۱]، ایمان سوری نژاد[۲]*، سعید تمدنی جهرمی[۳]، آرش اکبرزاده[۲]

تاریخ دریافت: تیر ۹۴ تاریخ پذیرش: شهریور ۹۴

چکیده

میگوی سرتیز رتبه دوم میزان صید میگوی را در استان هرمزگان داشته و در چرخه صید و صیادی خلیج فارس اهمیت زیادی دارد. از این رو، بررسی تنوع ژنتیکی این گونه مهم مد نظر قرار گرفت. نمونه‌های میگو از سه منطقه بندرعباس، بوشهر و آبادان جمع‌آوری شدند و برای توالی‌یابی ژن میتوکندریایی 16S rRNA مورد بررسی قرار گرفتند. بهینه‌سازی واکنش PCR جهت تکثیر ژن انجام شد. نتایج توالی‌یابی ژن 16S rRNA که شامل ۴۸۶ باز هم‌ردیف شده بود، ۴۸۰ جایگاه ژنی مونومورف، ۶ جایگاه ژنی پلی‌مورف و ۲ جایگاه انتقالی نشان داد. میانگین تنوع هاپلوتیپی برای نمونه‌های هر منطقه از ۰/۰۰۰±۰/۰۰۰ (بندرعباس) تا ۰/۳۳۳±۰/۲۱۵ (بوشهر) و ۰/۳۳۳±۰/۲۱۵ (آبادان) و میانگین تنوع نوکلئوتیدی برای نمونه‌های هر منطقه از ۰/۰۰۰±۰/۰۰۰ (بندرعباس) تا ۰/۰۰۳ ±۰/۰۰۳ (بوشهر) و ۰/۰۰۱±۰/۰۰۱ (آبادان) متغیر بود. میانگین تنوع هاپلوتیپی بین سه منطقه ۰/۶۰۸±۰/۰۰۷ و میانگین تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۲±۰/۰۰۳ محاسبه شد. نتایج بیانگر متوسط بودن میزان تنوع هاپلوتیپی و کم بودن میزان تنوع نوکلئوتیدی در مناطق مورد مطالعه بود. از آنجا که یکی از علل کاهش شدید جمعیت‌ها، فقدان تنوع ژنتیکی است، ارزیابی نتایج این بررسی و به کارگیری آن می‌تواند راه‌گشای مدیریت شیلاتی در بازسازی صحیح ذخایر این گونه با ارزش شود.

واژگان کلیدی: *تعیین توالی، تنوع ژنتیکی، خلیج فارس، 16S rRNA،* Metapenaeus affinis.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۲- استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۳- استادیار بخش ژنتیک، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، هرمزگان، بندرعباس، ایران.
* نویسنده مسئول: Sourinejad@hormozgan.ac.ir

مقدمه

بررسی تنوع ژنتیکی آبزیان به منظور اعمال مدیریت شیلاتی و بهره‌برداری پایدار ذخایر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Thorrold et al., 2002; Thai et al., 2006). تنوع ژنتیکی می‌تواند در تغییر اندازه جمعیتی موثر باشد، بنابراین کاهش جمعیت‌ها در نتیجه کاهش یا فقدان تنوع ژنتیکی رخ می‌دهد (Glenn et al., 1999). ارزیابی تنوع درون‌گونه‌ای و مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها اطلاعات با ارزشی را در راستای طبقه‌بندی و روند تکاملی در اختیار پژوهشگران قرار می‌دهد. همچنین این اطلاعات برای حفاظت از گونه‌های در معرض تهدید و در صنعت آبزی‌پروری مفید است (Valles-Jimenez et al., 2006; Vera et al., 2011).

خانواده Penaeidae شامل گروه‌های متنوعی از گونه‌های میگو است که در خورها و مصب‌ها و محیط‌های دریایی مناطق استوایی و نیمه استوایی در سراسر جهان یافت می‌شوند. میگوی سرتیز *Metapenaeus affinis* (H. Milne Edwards, 1837) که متعلق به خانواده Penaeidae و جنس *Metapenaeus* است، یکی از گونه‌های مهم میگو در آب‌های خلیج فارس به ویژه در استان هرمزگان به شمار می‌رود. میگوی سرتیز هر سال در فصل صید میگو از لحاظ میزان صید رتبه دوم را بعد از میگوی موزی به خود اختصاص می‌دهد و ذخایر آن در معرض برداشت بی‌رویه قرار دارد.

تغییرات محیطی با منشا طبیعی و انسانی ممکن است بر سطح تنوع ژنتیکی گونه‌ها در نواحی مختلف جغرافیایی تاثیر بگذارد (Cognetti and Maltagliati, 2004; Stamatis et al., 2004). استفاده از تفاوت موجود در توالی‌های DNA از دقیق‌ترین روش‌ها در طبقه‌بندی موجودات و تعیین تمایز و تنوع ژنتیکی آن‌ها است. در سال‌های اخیر DNA میتوکندریایی به طور گسترده‌ای به عنوان نشانگر ژنتیکی در گونه‌های مختلف میگوهای خانواده Penaeidae استفاده شده است. استفاده از این نشانگر به دلیل داشتن بسیاری از ویژگی‌های مطلوب مانند عدم نوترکیبی، وراثت از طریق مادری و نرخ بالای جهش، در بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی و روند تکاملی مناسب است (Garcia-Machado et al., 2001; Klinbunga et al., 2001; McMillen-Jackson and Bert, 2004). ژن 16S rRNA یکی از

نواحی بسیار متغیر در ژنوم میتوکندریایی است که سرعت پایین تکاملی از خود نشان می‌دهد و برای مطالعه تمایز و تنوع بین گونه‌ها، تعیین رابطه تبارشناسی ژنتیکی و تفکیک جمعیتی تا حد خانواده یا جنس با استفاده از تکنیک توالی‌یابی مفید است (Ketmaier et al., 2008; Calo-Mata et al., 2009). مروری بر مطالعات پیشین نشان می‌دهد که توالی‌یابی ژن 16S rRNA میتوکندریایی به طور موفقیت‌آمیزی برای بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف سخت‌پوستان دریایی استفاده شده است. سوری‌نژاد و همکاران (۱۳۹۳) با استفاده از توالی‌یابی ژن 16S rRNA میتوکندریایی، تنوع ژنتیکی میگوی موزی *Fenneropenaeus merguiensis* را در خوریات لافت و سیریک مورد بررسی قرار دادند. تنوع هاپلوتیپی درون جمعیتی و بین جمعیتی بالایی در بین جمعیت‌های این گونه در دو منطقه مورد بررسی گزارش شد. همچنین نتایج نشان داد که جمعیت‌های میگوی موزی در خوریات لافت و سیریک احتمالاً جمعیت‌های واحدی را از نظر ژنتیکی تشکیل می‌دهند هر چند به یقین یکی بودن جمعیت‌های دو منطقه قابل استنتاج نبود (سوری‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۳).

وحیدی‌نژاد و همکاران (۱۳۹۴) با استفاده از توالی‌یابی ژن 16S rRNA میتوکندریایی، تنوع ژنتیکی سخت‌پوست *Paramysis intermedia* از خانواده Mysidae را در برخی استخرهای پرورش میگوی استان‌های هرمزگان و سیستان و بلوچستان بررسی کردند. تنوع هاپلوتیپی درون‌جمعیتی و بین‌جمعیتی بالایی در بین جمعیت‌های *Paramysis* در دو منطقه تیاب (هرمزگان) در خلیج فارس و خلیج گواتر (سیستان و بلوچستان) در دریای عمان گزارش شد. میزان تنوع نوکلئوتیدی درون و بین‌جمعیتی *Paramysis* در منطقه تیاب در خلیج فارس بیش‌تر از خلیج گواتر در دریای عمان بود. همچنین نتایج نشان داد که جمعیت‌های *Paramysis* منطقه تیاب و خلیج گواتر احتمالاً جمعیت‌های مجزایی را از نظر ژنتیکی تشکیل می‌دهند (وحیدی‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۴).

رهنما و همکاران (۱۳۹۰) با استفاده از توالی‌یابی ژن 16S rRNA میتوکندریایی به مقایسه مولکولی میگوی ببری سبز *Penaeus semisulcatus* خلیج فارس و زیرگونه آن *Penaeus semisulcatus persicus* پرداختند. نتایج حاصل از تعیین توالی نشان داد که قطعه تکثیر شده دقیقاً دارای ۵۶۱ جفت

باز است. هم‌ردیفی توالی‌های 16S rRNA در گونه و زیرگونه این میگو از هر دو ناحیه بوشهر و بندرعباس نشان داد که توالی‌های به دست آمده از هر دو ناحیه دقیقاً با هم مطابقت دارند. نتیجه هم‌ردیفی توالی گونه و زیرگونه مذکور نشان داد که ۱۸ جانشینی بازی در این دو رخ داده است (رهنما و همکاران، ۱۳۹۰).

با وجود اهمیت بوم شناختی و اقتصادی میگوی سرتیز در خلیج فارس اطلاعاتی در زمینه تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی آن در دسترس نیست. هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی میگوی سرتیز در آب‌های شمال خلیج فارس در مناطق بندرعباس، بوشهر و آبادان با استفاده از توالی‌یابی ژن 16S rRNA میتوکندریایی است که با توجه به مرور منابع پیشین، تاکنون بدان پرداخته نشده است. با دست‌یابی به این هدف می‌توان در آینده نزدیک برای خزانه ژنی، بازسازی ذخایر و بهره‌برداری بهینه از جمعیت‌ها و به دنبال آن با توجه به لزوم مولدسازی این گونه، در برنامه‌های تکثیر و پرورش مدیریت مناسب‌تری را اعمال کرد.

مواد و روش‌ها

میگوی سرتیز *Metapenaeus affinis* نابالغ، به تعداد ۱۸ عدد، با استفاده از تور ترال از آب‌های ساحلی خلیج فارس در مناطق بندرعباس، بوشهر و آبادان (۶ عدد از هر منطقه) جمع آوری شد (شکل ۱) و پس از تثبیت در الکل ۹۶ درصد به آزمایشگاه ژنتیک پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان انتقال یافتند.

استخراج DNA با روش فنل- کلروفرم با اندک تغییراتی از بافت پای شنای میگو انجام گرفت (Taggart et al., 1992) و DNA الگو در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل و در دمای چهار درجه سانتیگراد قرار داده شد. قبل از انجام PCR، کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و کمیت DNA با تزریق دو میکرولیتر نمونه DNA در دستگاه NanoDrop ارزیابی شد. جهت تعیین ساختار جمعیتی در میگوی سرتیز از روش توالی‌یابی مستقیم ژن 16S rRNA استفاده شد. بدین منظور ژن 16S rRNA به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با بهره‌گیری از یک جفت آغازگر به شرح جدول ۱ که پیش از این برای تکثیر ژن 16S rRNA در خانواده Penaeidae استفاده شده بود، تکثیر شد (Palumbi et al., 1991).

شکل ۱: مناطق نمونه‌برداری از میگوی سرتیز در خلیج فارس با فلش مشخص شده‌اند.

جدول ۱: آغازگر مورد استفاده در PCR ژن 16S rRNA میگوی سرتیز

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر
Forward, 16Sar5′	5′-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3′
Reverse, 16Sbr3′	5′-CCG GTY TGA ACT CAG ATC AYG T-3′

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ویال ۵۰ میکرولیتری با ۱۰۰ نانوگرم DNA، پنج میکرولیتر بافر PCR (10 X)، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۰/۲ میکرومول از هر آغازگر و ۲ واحد آنزیم Taq DNA پلیمراز با غلظت ۵u/µL (سیناژن، ایران) انجام شد. واکنش PCR برای تکثیر ژن مذکور در دستگاه ترموسایکلر (MJ Research، مدل PTC-100، آمریکا) با تنظیم دمای الحاق و بهینه‌سازی برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر صورت گرفت. مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه

و با تعداد یک چرخه انجام شد. مرحله واسرشته‌سازی ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله الحاق در دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و با تعداد ۳۰ چرخه صورت پذیرفت. برای بسط نهایی، از دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و تعداد یک چرخه استفاده شد.

پنج میکرولیتر از محصول PCR تمامی نمونه‌ها به همراه مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت باز (Fermentas GmbH، آلمان) در ژل آگارز یک درصد، الکتروفورز شد و بقیه آن‌ها پس از ارسال به بخش مولکولی شرکت ماکروژن، خالص‌سازی و به عنوان DNA الگو برای توالی‌یابی استفاده شدند. واکنش‌های توالی‌یابی DNA به همراه آغازگر Forward با بسته BigDye (BigDye Kit، Applied Biosystems، آمریکا) نسخه ۳/۱ و توسط دستگاه DNA Analyzer (مدل XL3730، Applied Biosystems، آمریکا) انجام شد.

پس از توالی‌یابی، با استفاده از نرم افزار BioEditو ابزار قدرتمند Blast و رویه Blasten در پایگاه NCBI میزان همولوژی توالی‌های به دست آمده، سنجیده شد. پس از دریافت توالی‌ها، بازنگری توالی‌های مشابه با نرم افزار Chromas 2.23 انجام شد. به منظور شناسایی اختلاف میان توالی‌ها، نمونه‌های توالی‌یابی شده با نرم افزار Clustal W هم‌ردیف شدند (Thompson et al., 1997). شاخص‌های تنوع مولکولی مانند تعداد هاپلوتیپ‌ها، مکان‌های پلی‌مورف، تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی به همراه واریانس بر اساس مدل Nei (Nei, 1978) و هتروزایگوسیتی مورد انتظار (Expected heterozygosity) با استفاده از نرم افزار Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 1992) و نرم افزار DnaSp (Rozas et al., 2003) محاسبه شدند.

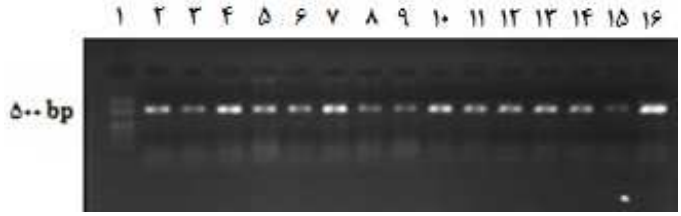
نتایج

بررسی کیفیت DNA نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت قابل قبولی برخوردار است (شکل ۲).

بهینه‌سازی واکنش PCR برای تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از شیب دمایی ۶۰-۴۸ درجه سانتی‌گراد نشان داد که مناسب‌ترین دما برای اتصال آغازگر، دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد بود. آغازگرهای ′16Sar5 و ′16Sbr3 امکان تکثیر بخشی از 16S rRNA

به طول تقریبی ۵۲۰ جفت باز را فراهم کردند. الگوی باندی محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد در شکل ۳ نشان داده شده است.

شکل ۲: الکتروفورز DNA استخراج شده به روش فنل کلروفرم از پای شنای میگوی سرتیز



شکل ۳: الگوی باندی محصول PCR ژن 16S rRNA روی ژل آگارز. ۱: مارکر ۱۰۰bp، ۲ تا ۶: نمونه‌های بندرعباس، ۷ تا ۱۱: بوشهر و ۱۲ تا ۱۶: آبادان

بر اساس نتایج هم‌ردیفی توالی‌های 16S rRNA میگوی سرتیز از مناطق بندرعباس، بوشهر و آبادان پس از دریافت اطلاعات به صورت فایل کروماس، توالی‌های فوق دقیقاً به اندازه ۴۸۶ جفت باز ردیف شدند. پس از آنالیز توالی‌های به دست آمده در نرم افزار افزار DnaSp، ۴ هاپلوتیپ به دست آمد که هاپلوتیپ شماره یک با بیش‌ترین تعداد (شش) متعلق به منطقه بندرعباس منحصر به فرد (Unique) بود. هاپلوتیپ شماره ۳ منطقه بوشهر و هاپلوتیپ شماره ۴ منطقه آبادان نیز با کمترین تعداد (یک) منحصر به فرد بودند. هاپلوتیپ شماره دو با بیش‌ترین تعداد (پنج) بین دو منطقه بوشهر و آبادان مشترک بودند (جدول ۲).

آنالیز ۴۸۶ جفت باز توالی 16S rRNA میگوی سرتیز با نرم افزار DnaSp نشان داد که ۴۸۰ جایگاه ژنی مونومورف، ۶ جایگاه ژنی پلی‌مورف، ۲ جایگاه انتقالی (Transitions)، ۰/۳ جایگاه متقاطع (Tranvertions)، عدم مشاهده پلی‌مورفیسم اضافه و حذف (Insertion-Deletion Polymorphism) و

۶ جهش وجود داشت و نرخ متوسط جهش در این گونه اندک بود.

میزان تنوع هاپلوتیپی و تنوع نوکلئوتیدی برای تمامی نمونه‌ها به ترتیب ۰/۶۰۸±۰/۰۰۷ و ۰/۰۰۲±۰/۰۰۳ به دست آمد. تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی نمونه‌های جمع‌آوری شده از بندرعباس به دلیل وجود یک آلل و هاپلوتیپ، ۰/۰۰۰ محاسبه شد یعنی همگی نمونه‌ها یکسان بودند و هیچ گونه تفاوتی بین آن‌ها وجود نداشت (جدول ۳).

جدول ۲: پراکنش هاپلوتیپی ژن 16S rRNA میگوی سرتیز

هاپلوتیپ / ناحیه	۱	۲	۳	۴	جمع
بندرعباس	۶				۶
بوشهر		۵	۱		۶
آبادان		۵		۱	۶
جمع	۶	۱۰	۱	۱	۱۸

جدول ۳: تنوع ژنتیکی ژن 16S rRNA میگوی سرتیز در مناطق مورد مطالعه

ناحیه / پارامتر	آبادان	بوشهر	بندرعباس
تعداد نمونه‌های مورد بررسی	۶	۶	۶
جایگاه‌های مورد بررسی	۴۸۶	۴۸۶	۴۸۶
تعداد جایگاه‌های پلی‌مورف	۲	۵	۰
پلی‌مورفیسم اضافه و حذف	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
تعداد هاپلوتیپ	۲	۲	۱
تنوع نوکلئوتیدی	۰/۰۰۱ ± ۰/۰۰۱	۰/۰۰۳ ±۰۰۳/۰	۰/۰۰۰ ±۰۰۰/۰
تنوع هاپلوتیپی	۰/۲۱۵ ±۳۳۳/۰	۰/۲۱۵ ± ۰/۳۳۳	۰/۰۰۰ ± ۰/۰۰۰
هوموزیگوسیتی	۰/۶۶۶	۰/۶۶۶	۱/۰۰۰

ترکیب نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA میگوی سرتیز در مناطق بندرعباس، بوشهر و آبادان در جدول ۴ نشان داده شده است. مطالعه ترکیب نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA نشان داد که این توالی غنی از بازهای T و A (۶۵/۵۶ درصد) بود.

جدول ۴: ترکیب نوکلوتیدی توالی‌های ژن 16S rRNA میگوی سرتیز در مناطق مورد مطالعه

	ترکیب نوکلئوتیدی (درصد)				
	C	T	A	G	جمع
بندرعباس	۲۱/۸۱	۲۹/۸۴	۳۵/۶۰	۱۲/۷۶	۱۰۰
بوشهر	۲۱/۸۱	۲۹/۸۰	۳۵/۸۰	۱۲/۵۹	۱۰۰
آبادان	۲۱/۸۱	۲۹/۸۴	۳۵/۸۰	۱۲/۵۵	۱۰۰

بحث

در مطالعه حاضر از ژن 16S rRNA میتوکندریایی برای بررسی تنوع ژنتیکی گونه میگوی سرتیز در سواحل جنوبی کشور استفاده شد و توالی‌یابی این ژن اطلاعات مفیدی را در خصوص پارامترهای تنوع ژنتیکی میگوی سرتیز در مناطق مورد مطالعه در اختیار گذاشت. تمام DNAهای استخراج شده دارای کیفیت و کمیت قابل قبولی برای انجام PCR بودند به طوری که تمامی محصول PCR روی ژل آگارز بدون هیچ گونه آلودگی پروتئینی و یا باند اضافه مشاهده شدند.

در پژوهش حاضر جهت ردیف کردن توالی های‌ژن 16S rRNA میگوی سرتیز از منوی Clastal W موجود در برنامه Mega 4 و تحت شبکه بانک ژن NCBI استفاده شد که ۴۸۶ جفت باز ردیف شدند. تمامی توالی‌یابی‌های انجام شده در این بررسی فاقد هر گونه موارد حذف یا اضافه شدن بودند، بنابراین داده‌های مناسب و صحیحی را برای محاسبات آماری فراهم کردند.

تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، عاملی مهم و اساسی در تکامل و حفاظت زیستی آن‌ها است زیرا سطوح بالای تنوع ژنتیکی، توانایی جمعیت‌ها را در پاسخ به انتخاب طبیعی و بازماندگی افراد آن جمعیت، افزایش می‌دهد. در این بررسی ۴۸۶ جفت باز ردیف شده از توالی ژن 16S rRNA در بین جمعیت‌های

سه منطقه، ۶ جهش نشان داد که بیانگر نرخ اندک جهش در این گونه بود. میزان تنوع هاپلوتیپی برای تمامی نمونه‌ها ۰/۶۰۸±۰/۰۰۷ به دست آمد. همچنین تعداد چهار هاپلوتیپ شناسایی شد که هاپلوتیپ شماره یک مختص منطقه بندرعباس بود و به دلیل داشتن تنها یک آلل، تنوع مولکولی محاسبه نشد و میزان هوموزیگوسیتی نمونه‌های این منطقه نیز در بالاترین حد خود قرار داشت. این مطلب نشان می‌دهد که نمونه‌های منطقه بندرعباس دارای هیچ گونه تنوع آللی نبوده و باید در راستای ایجاد تنوع در جمعیت آن اقدامات اساسی و علمی صورت پذیرد. میزان تنوع نوکلئوتیدی برای تمامی نمونه‌ها نیز ۰/۰۰۲±۰/۰۰۳ به دست آمد. تنوع نوکلئوتیدی نیز بسیار اندک محاسبه شد که مقدار اندک این شاخص با سایر مقادیر تنوع ژنتیکی به دست آمده مطابقت دارد.

در مقایسه با نتایج مطالعه حاضر، نتایج بررسی تنوع ژنتیکی میگوی موزی *Fenneropenaeus merguiensis* در خوریات لافت و سیریک استان هرمزگان با توالی‌یابی ژن 16S rRNA موید تنوع ژنتیکی بالای این میگو در مناطق مورد مطالعه نسبت به تنوع ژنتیکی مشاهده شده در میگوی سرتیز در منطقه بندرعباس بود (سوری‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۳). در این ارتباط می‌توان به وجود خوریات و جنگل‌های حرا در مناطق لافت و سیریک اشاره داشت. جنگل‌های حرا یکی از مهم‌ترین مناطق نوزاد گاهی و تغذیه لارو ماهیان و سخت‌پوستان به حساب می‌آیند. در دو منطقه لافت و سیریک وجود خور و مصب و همچنین پراکنش جنگل‌های حرا زیستگاه‌های متعدد مناسبی را از لحاظ فراهم بودن منابع غذایی و وجود پناهگاه برای مرحله نوزادی و پست‌لاروی میگوی موزی فراهم می آورند و نقش عمده‌ای در عدم انتقال مولدین و پست‌لاروها به مناطق دیگر از جمله بندرعباس خواهند داشت. وجود تنوع مولکولی به دست آمده در میگوی موزی این دو منطقه می‌تواند در نتیجه این سدهای گیاهی و همچنین وجود تنوع زیستگاهی در خوریات و جنگل‌های حرا باشد (سوری‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۳). از طرف دیگر، در منطقه بندرعباس ایجاد تغییرات محیطی با منشا انسانی از جمله وجود آلاینده‌های دریایی به ویژه آلودگی نفتی و عوارض منفی تردد شناورها قادر خواهند بود سطح تنوع زیستی و ژنتیکی آبزیان را در این مناطق ساحلی تحت تاثیر قرار دهند که در سایر مطالعات نیز بدین عوامل اشاره شده است

Cognetti and Maltagliati, 2004;) Stamatis et al., 2004).

تراز تنوع هاپلوتیپی می‌تواند از صفر (تمام افراد جمعیت دارای هاپلوتیپ یکسان) تا یک (تمام افراد جمعیت دارای هاپلوتیپ‌های متفاوت) متغیر باشد. در مطالعات مشابه، در گونه‌های میگوی ببری سیاه *Penaeus monodon* (Benzie et al., 2002)، میگوی سفید غربی *Litopenaeus vannamei* (Valles-Jimenez et al., 2006) ، میگوی Farfantepenaeus *duorarum* (McMillen-Jackson and Bert, 2004)، میگوی *Litopenaeus setiferus* (McMillen-Jackson and Bert, 2003) و میگوی چینی *Fenneropenaeus chinensis* (Kong et al., 2010) در دریای زرد و دریای Bohai سطوح متوسط تا بالای تنوع ژنتیکی میتوکندریایی گزارش شد. در تناقض با نتایج این مطالعات، تنوع هاپلوتیپی پایینی (۰/۲۴) در میگوی چینی *Fenneropenaeus chinensis* در شمال غرب اقیانوس آرام گزارش شده است (Cui et al., 2007).

به طور کلی میزان تنوع هاپلوتیپی متوسط تا بالا برای گونه‌های دریایی و به ویژه راسته ده‌پایان به بزرگ بودن اندازه جمعیت و پراکندگی گسترده در فواصل زیاد نسبت داده می‌شود که به نگهداری بسیاری از هاپلوتیپ های منحصر به فرد در طول رشد و پراکنش جمعیت منجر می‌شود (Bucklin and Wiebe, 1998; Peijnenburg et al., 2004; Stamatis et al., 2004; Zardoya et al., 2004). البته اندازه جمعیت موثر ممکن است در نواحی مختلف جغرافیایی که پراکنش گونه جریان دارد به دلیل فرآیند پویایی جمعیت در طول تاریخ تغییر کند و در نتیجه سطوح تنوع ژنتیکی نیز دستخوش تغییراتی شود. علاوه بر این، پویایی تکاملی (جهش، رانش ژنتیکی، انتخاب طبیعی) که در سطوح مختلف بر موجود تاثیر می‌گذارند نیز ممکن است باعث بروز الگوهای متفاوت تنوع ژنتیکی شود (De Croos and Palsson, 2010).

یکی دیگر از عواملی که سبب ایجاد تفاوت در تنوع ژنتیکی میگوی سرتیز در منطقه بندرعباس با دو منطقه بوشهر و آبادان شده است احتمالاً جدایی جغرافیایی و فاصله مکانی بین جمعیت‌ها است (Wang et al., 2008). با افزایش فاصله جغرافیایی فاصله ژنتیکی افزایش می‌یابد که علت آن کاهش جریان ژنی در اثر

وجود موانع فیزیکی و یا طبیعی است (Beacham et al., 2004). اصولاً اختلاف ژنتیکی بین جمعیت‌ها در نتیجه مجتمع شدن افراد در یک منطقه ویژه 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). بنابراین، با توجه به نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد جابه‌جایی و تبادل جریان ژنی بیش‌تری بین جمعیت‌های بوشهر و آبادان وجود دارد که به نسبت از تبادل ژنی بین منطقه بندرعباس و دو منطقه دیگر بیش‌تر است.

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر که اولین بررسی در مورد تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت میگوی سرتیز در آب‌های ساحلی بندرعباس، بوشهر و آبادان با استفاده از توالی‌یابی ژن میتوکندریایی 16S rRNA بود، نشان داد که نشانگرهای ملکولی به ویژه نشانگرهای میتوکندریایی می‌توانند به صورت ابزاری مناسب در جهت بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های آبزیان از جمله میگوی سرتیز به کار روند. همچنین از این گونه نشانگرها می‌توان در گونه‌هایی با خویشاوندی نزدیک و با جد و نیای مشترک به راحتی استفاده کرد. در این بررسی مشخص شد که تنوع هاپلوتیپی متوسط و تنوع نوکلئوتیدی کم در بین جمعیت‌های این گونه در مناطق مورد مطالعه وجود دارد. البته نتیجه‌گیری نهایی در این باره هنوز زود است و به کارگیری سایر ژن های میتوکندریایی به همراه روش‌های دیگر مانند مایکروستلایت، RFLP، AFLP و غیره ضروری به نظر می‌رسد. از آنجا که یکی از علل کاهش شدید جمعیت‌ها، فقدان تنوع ژنتیکی است، ارزیابی نتایج این بررسی و مطالعات جامع‌تر آینده و به کارگیری نتایج آن‌ها می‌تواند راه‌گشای مدیریت شیلاتی در بازسازی صحیح جمعیت‌ها و ذخایر این گونه با ارزش شود.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای مهندس فریدون چکمه‌دوز، کارشناس ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی، بندر انزلی، به دلیل همکاری در آنالیزهای نرم افزاری کمال تشکر به عمل می‌آید.

منابع

رهنما ر.، حسینی س.ج.، قاسمی س.ا.، یاوری و.، ذوالقرنین ح. و متین‌فر ع. ۱۳۹۰. مقایسه مولکولی اولیه *P.(penaeus) semisulcatus* خلیج فارس و زیرگونه آن *P.(penaeus) semisulcatus* با استفاده از 16S rRNA میتوکندریایی. ژنتیک نوین، ۶(۲): ۳۱-۲۳.

سوری‌نژاد ا.، کشاورزی ف.، تمدنی جهرمی س. و وحیدی‌نژاد س. ۱۳۹۳. بررسی مقدماتی فیلوژنی و ساختار ژنتیکی میگوی موزی *Fenneropenaeus merguiensis* در خوریات لافت و سیریک خلیج فارس با استفاده از توالی یابی ژن میتوکندریایی 16S rRNA. تاکسونومی و بیوسیستماتیک، ۶(۲۰): ۳۶-۲۳.

وحیدی‌نژاد س.، سوری‌نژاد ا.، تمدنی جهرمی س.، اکبرزاده آ.، کشاورزی ف. و چکمه‌دوز قاسمی ف. ۱۳۹۴. تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی سخت‌پوست *Paramysis intermedia* در مناطق تیاب و خلیج گواتر با استفاده از توالی‌یابی ژن میتوکندریایی 16S rRNA. شیلات، مجله منابع طبیعی ایران، ۶۸(۲): ۳۴۲-۳۲۹.

Beacham T.D., Lapointe M., Candy J.R., McIntosh B., MacConnachie C., Tabata A., Kaukinen K., Deng L., Miller K.M. and Withler R.E. 2004. Stock identification of Fraser River sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) using microsatellites and major histocompatibility complex variation. Transactions of the American Fisheries Society, 133: 1106–1126.

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: 2553–2569.

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.

Cognetti G. and Maltagliati F. 2004. Strategies of genetic biodiversity conservation in the

marine environment. Marine Pollution Bulletin, 48: 811–812.

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.

De Croos M.D.S.T. and Palsson 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.

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.

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.

Glenn T.C., Stephan W. and Braun M.J. 1999. Effects of a population bottleneck on whooping crane mitochondrial DNA variation. Conservation Biology, 13: 1097–1107.

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.

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 mitrochondrial DNA RFLP analysis. Marine Biotechnology, 3: 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.

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.

Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and Genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583–590.

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, Zoology Department, Honululu. 94P.

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., Vazquez E. and Sanchez J.A. 2007. Genetic diversity of black spot seabream (*Pagellus bogaraveo*) populations Spanish Coasts: A preliminary study. Marine Biology, 151: 2153–2158.

Rozas J., Sanchez-DelBarrio J.C., Messeguer X. and Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by thecoalescent and other methods. Bioinformatics, 19: 2496–2497.

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: 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.

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 Acids 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.

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.

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: 1785–1798.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 3, No. 2, Summer 2015

Genetic diversity of Jinga shrimp *Metapenaeus affinis* in the Persian Gulf based on mitochondrial gene 16S rRNA sequencing

Fatemeh Shahrani Korani[1], Iman Sourinejad[2]*, Saeid Tamadoni Jahromi[3], Arash Akbarzadeh[2]

Received: July 2015 Accepted: September 2015

Abstract

Regarding the importance of Jinga shrimp in catch cycle of the Persian Gulf and its second rank in shrimp catch in Hormozgan province, genetic diversity of this species was assessed based on sequencing of mitochondrial 16S rRNA gene. Shrimp samples were collected from the regions of Bandar Abbas, Bushehr and Abadan, and PCR reaction for amplification of 16S rRNA was optimized. The results of 16S rRNA gene sequencing including 486 aligned base pairs yielded 480 monomorphic loci, 6 polymorphic loci and 2 transitions. Mean haplotype diversity in each region was recorded from 0.000±0.000 (Bandar Abbas) to 0.333±0.215 (Bushehr) and 0.333±0.215 (Abadan), and mean nucleotide diversity from 0.000±0.000 (Bandar Abbas) to 0.003±0.003 (Bushehr) and 0.001±0.001 (Abadan). Haplotype and nucleotide diversity of all samples were 0.608±0.007 and 0.002±0.003, respectively. Results of this study revealed the intermediate haplotype diversity and low nucleotide diversity of Jinga shrimp in the studied regions. As one of the reasons for severe decrease of populations is the lack of genetic diversity, the analysis of these results and its application can be useful for fisheries management in appropriate restocking of this valuable species.

Key words: *Sequencing*, *Genetic Diversity*, *Persian Gulf*, *16S rRNA*, Metapenaeus affinis.

1- M.Sc. Student, Department of Fisheries, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
3- Assistant Professor in Department of Genetics, Persian Gulf and Oman Sea Research Center, Hormozgan Province, Bandar Abbas, Iran.
*Corresponding Author: Sourinejad@hormozgan.ac.ir