بررسی مقدماتی ساختار ژنتیکی جمعیت میگوی سرتیز (*Metapenaeus affinis*) در آب‌های شمال خلیج‌فارس به‌روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA

- **فاطمه شهرانی‌کرانی:** گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، صندوق‌پستی: ۳۹۹۵
- **ایمان سوری‌نژاد*:** گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، صندوق‌پستی: ۳۹۹۵
- **سعید تمدنی‌جهرمی:** بخش ژنتیک، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، بندرعباس، صندوق پستی: ۱۵۹۷
- **آرش اکبرزاده:** گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، صندوق پستی: ۳۹۹۵

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۳

چکیده

با توجه به اهمیت میگوی سرتیز (*Metapenaeus affinis*) در چرخه صیادی خلیج‌فارس، بررسی مقدماتی ساختار ژنتیکی جمعیت این گونه با توالی‌یابی ژن میتوکندریایی 16S rRNA انجام شد. تعداد ۱۸ قطعه میگو از سه منطقه بندرعباس، بوشهر و خوزستان جمع‌آوری و پس از استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم، بهینه‌سازی واکنش PCR جهت تکثیر ژن 16S rRNA انجام شد. بیش‌ترین مقدار فاصله ژنتیکی، بین جمعیت بندرعباس و خوزستان (۰/۷۵۰) و کم‌ترین مقدار فاصله ژنتیکی بین مناطق بوشهر و خوزستان (۰/۱۰۵-) به‌دست آمد. در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت جمعیت میگوی سرتیز منطقه بندرعباس با دو منطقه بوشهر و خوزستان معنی‌دار بود ولی این تفاوت جمعیتی بین بوشهر و خوزستان با یکدیگر معنی‌دار نبود که توسط آزمون تفاوت جمعیت در داخل جمعیت‌ها نیز مورد تأیید قرار گرفت. میانگین آزمون‌های بی‌طرفی تاجیما و شاخص Fu's FS برای ۱۸ توالی بین مناطق به‌ترتیب ۰/۸۲۳- و ۱/۱۸۱ محاسبه شد که هیچ‌کدام از دو شاخص از لحاظ آماری معنی‌دار نبودند (p>۰/۰۵). درخت‌های رسم شده جدایی جمعیتی منطقه بندرعباس را از دو منطقه دیگر نشان دادند که این فرضیه نیازمند آزمون‌های تکمیلی با تعداد نمونه بیش‌تر و آنالیز سایر ژن‌های میتوکندریایی و ژنومی می‌باشد.

کلمات کلیدی: تعیین توالی، ساختار جمعیت، خلیج‌فارس، 16S rRNA، میگوی سرتیز

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Sourinejad@hormozgan.ac.ir

مقدمه

دانستن ساختار ژنتیکی آبزیان برای حفاظت از گونه‌ها و جمعیت‌ها و حفظ تنوع‌زیستی دارای اهمیت می‌باشد. شناسایی ژنتیکی ذخایر هم‌چنین یکی از اولویت‌های مهم به‌منظور یافتن منابع طبیعی بکر برای اطمینان از به‌گزینی گونه‌ها می‌باشد. ذخایر گوناگون آبزیان اغلب از جهت میزان رشد، مقاومت در برابر بیماری یا سایر خصوصیت‌های مهم، یکسان نیستند، بنابراین اطلاع در زمینه این خصوصیات و ارتباط آن‌ها با ژنوتیپ‌های مشخص در جهت بهبود برنامه‌ها و توسعه سیستم تکثیر و پرورش گونه‌های مورد مطالعه موثر می‌باشد (Xu و همکاران، ۲۰۰۱؛ Lester و Pante، ۱۹۹۲).

بررسی تمایز جمعیت‌های آبزیان با سه روش متداول مانند استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی، نشانگرهای پروتئینی و مولکولی (DNA و mtDNA) انجام می‌گیرد. روش مولکولی استفاده از تفاوت در توالی‌های DNA از دقیق‌ترین روش‌ها در طبقه‌بندی موجودات و تعیین ساختار ژنتیکی آن‌ها می‌باشد، به‌طوری‌که امروزه نشانگرهای DNA به ابزاری قابل اعتماد در مطالعات تنوع گونه‌ای تبدیل شده‌اند (Templeton، ۲۰۰۲).

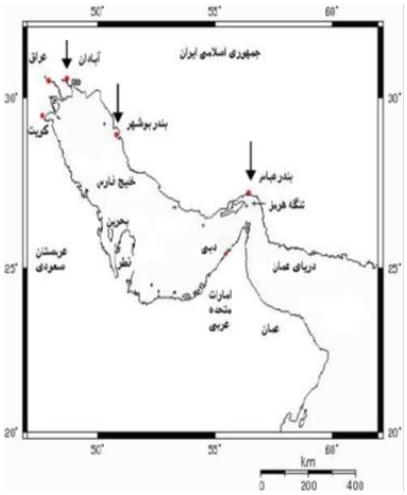
ژنوم میتوکندریایی (mtDNA) به‌طور گسترده‌ای در بررسی جمعیت‌های گونه‌های مختلف آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد و کارایی خوبی در بررسی ساختار ژنتیکی و جداسازی جمعیت‌ها دارد (Valles-Jimenez و همکاران، ۲۰۰۶). توالی‌یابی ژنوم میتوکندریایی (mtDNA sequencing) یکی از پرکاربردترین روش‌ها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی و فیلوژئوگرافی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به‌هم محسوب می‌شود (Bruford و همکاران، ۲۰۰۳). ژن 16S rRNA یکی از نواحی بسیار متغیر در ژنوم میتوکندریایی می‌باشد که در بررسی ساختار ژنتیکی و تعیین میزان قرابت خویشاوندی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای با استفاده از تکنیک توالی‌یابی کاربرد دارد (Calo-Mata و همکاران، ۲۰۰۹).

خانواده پنائیده شامل گروه متنوعی از گونه‌های میگو است که در خورها و مصب‌ها و محیط‌های دریایی مناطق استوایی و نیمه استوایی در سراسر جهان یافت می‌شوند. میگوهای خانواده پنائیده از لحاظ ارزش صید و صیادی نقش قابل توجهی را در اکثر منابع آبی جهان دارا بوده و به‌طور وسیعی نیز مورد پرورش قرار می‌گیرند. اهمیت اکولوژیکی و اقتصادی میگوهای خانواده پنائیده منجر به اجرای تحقیقات زیست‌شناختی و ژنتیکی گسترده‌ای در گونه‌ها و جمعیت‌های آن شده است. در محدود مطالعات توالی‌یابی این خانواده در ایران، رهنما و همکاران (۱۳۹۰) به مقایسه مولکولی اولیه میگوی ببری سبز *Penaeus semisulcatus* خلیج فارس که گونه غالب در آب‌های استان بوشهر می‌باشد و زیرگونه آن *Penaeus semisulcatus persicus* با استفاده از 16S rRNA میتوکندریایی پرداختند. نتایج حاصل از تعیین توالی نشان داد که قطعه تکثیر شده دقیقاً دارای ۵۶۱ جفت باز است. هم‌ردیفی توالی‌های گونه 16S rRNA و زیرگونه آن از هر دو ناحیه بوشهر و بندرعباس نشان داد که توالی‌های 16S rRNA از هر دو ناحیه بوشهر و بندرعباس دقیقاً با هم مطابقت دارند ولی این توالی‌ها در گونه و زیرگونه تفاوت دارند.

میگوی سرتیز *Metapenaeus affinis* (H. Milne Edwards, 1837) متعلق به خانواده Penaeidae و جنس *Metapenaeus*، یکی از گونه‌های مهم میگو در آب‌های خلیج‌فارس به‌خصوص در استان هرمزگان به‌شمار می‌رود که هر سال در فصل صید میگو از لحاظ میزان صید رتبه دوم بعد از میگوی موزی را به‌خود اختصاص می‌دهد و ذخایر آن در معرض برداشت بی‌رویه قرار دارد. از آن‌جاکه اطلاعات خاصی در مورد ساختار ژنومیک این گونه موجود نمی باشد در تحقیق حاضر با استفاده از روش توالی‌یابی ژنوم میتوکندریایی، بررسی مقدماتی ساختار جمعیتی این گونه در خلیج‌فارس مدنظر قرار گرفت. با بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت میگوی سرتیز در خلیج‌فارس می‌توان مدیریت مناسب‌تری را برای برنامه‌های بلند مدت حفظ و ارزیابی ذخایر، ارزیابی وضعیت زیست‌شناختی و بوم‌شناختی گونه و به‌دنبال آن برنامه‌های تکثیر و پرورش اعمال نمود. هم‌چنین با توجه به لزوم مولدسازی در تکثیر و پرورش این گونه در آینده نزدیک، آگاهی از ساختار جمعیتی می‌تواند در جهت انتخاب و تولید مولدین مناسب با ذخایر ژنی متفاوت مورد استفاده قرار گیرد که این موضوع، احتمال آمیزش خویشاوندی را کاهش داده و ضریب رشد و درصد بقای بالای لاروها را تأمین می‌نماید.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۸ عدد میگوی سرتیز با استفاده از تور ترال از آب‌های ساحلی خلیج‌فارس در مناطق هرمزگان، بوشهر و خوزستان (شکل ۱) جمع‌آوری و پس از تثبیت در الکل ۹۶ درصد به آزمایشگاه ژنتیک پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان انتقال یافتند. استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم (Taggart و همکاران، ۱۹۹۲) از پاهای شنای میگو انجام شد. قبل از انجام PCR، کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد.



شکل ۱: مناطق نمونه‌برداری از میگوی سرتیز در خلیج‌فارس

جهت تعیین ساختار جمعیتی در میگوی سرتیز از روش توالی‌یابی مستقیم ژن 16S rRNA استفاده شد. بدین منظور، ژن 16S rRNA به‌روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با بهره‌گیری از یک جفت آغازگر به‌شرح جدول ۱ که پیش از این برای تکثیر ژن 16S rRNA در خانواده Penaeidae استفاده شده بود تکثیر گردید (Palumbi و همکاران، ۱۹۹۱).

جدول ۱: آغازگر مورد استفاده در PCR

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر
Forward, 16Sar 5'	5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'
Reverse, 16Sbr 3'	5'-CCG GTY TGA ACT CAG ATC AYG T-3'

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۱۰۰ نانوگرم، DNA PCR Buffer (10 X)، MgCl2 (۵۰ میلی‌مولار)، dNTPs (۱۰ میلی مولار)، آغازگر (۱۰ ماکرومول) و آنزیم Taq DNA پلیمراز با غلظت ۵u/µl (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 انجام شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر ژن مذکور با تنظیم دمای الحاق و بهینه‌سازی برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر مطابق جدول ۲ صورت گرفت.

بهینه‌سازی واکنش PCR جهت 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 است. ۵ میکرولیتر از محصول PCR تمامی نمونه‌ها به‌همراه نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز (Fermentas GmbH, Germany) در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و بقیه آن‌ها پس از ارسال به بخش مولکولی شرکت ماکروژن، خالص‌سازی (Purify) و به‌عنوان DNA الگو برای توالی‌یابی استفاده شدند. واکنش‌های توالی‌یابی DNA به همراه آغازگر forward با بسته (BigDye (BigDye kit v3.1 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA و توسط دستگاه DNA analyzer مدل ,Applied Biosystems) XL3730 USA) انجام شد.

جدول ۲: برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن 16S rRNA

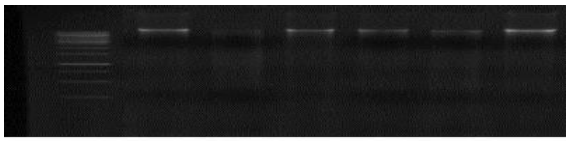
مراحل PCR	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشته‌سازی اولیه	۹۵	۳ دقیقه	۱
واسرشته‌سازی	۹۵	۳۰ ثانیه	
الحاق	۴۸	۴۵ ثانیه	۳۰
بسط	۷۲	۶۰ ثانیه	
بسط نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

پس از توالی‌یابی، با استفاده از نرم‌افزار BioEdit و ابزار قدرتمند Blast و رویه Blasten در پایگاه NCBI میزان همولوژی توالی‌های به‌دست آمده سنجیده شد. پس از دریافت توالی‌ها، بازنگری توالی‌های مشابه با نرم‌افزار Chromas 2.23 انجام شد. به‌منظور شناسایی اختلاف میان توالی‌ها، نمونه‌های توالی‌یابی شده با نرم‌افزار Clustal W هم‌ردیف شدند (Thompson و همکاران، ۱۹۹۷). براساس نتایج هم ردیفی توالی‌های16S rRNA میگوی سرتیز از مناطق هرمزگان، بوشهر و خوزستان پس از دریافت اطلاعات به‌صورت فایل کروماس، توالی‌های فوق دقیقاً به اندازه ۴۸۶ باز ردیف شدند.

واگرایی ژنتیکی (Fst) که نشانه جدایی جمعیت‌ها می‌باشد به‌صورت جفتی بین مناطق نمونه‌برداری با ۱۰۰۰ تکرار با استفاده از نرم‌افزار Arlequin 3.1 (Excoffier و همکاران، ۱۹۹۲) و نرم‌افزار DnaSp (Rozas و همکاران، ۲۰۰۳) محاسبه شد. فرضیه صفر مبنی بر مستقل بودن جمعیت‌ها با استفاده از آزمون دقیق (exact test) براساس اختلاف هاپلوتیپی بین جمعیت‌ها محاسبه شد. گسترش و پراکنش تاریخ جمعیتی (Historical demographic and spatial expansions) با دو روش تست تاجیما (D-test of Tajima) (Rozas و همکاران، ۲۰۰۳) و تست Fu's FS (Fu، ۱۹۹۷) با استفاده از نرم‌افزار Arlequin 3.1 بررسی شد. درخت فیلوژنی به روش نزدیک‌ترین هم‌جواری (Neighbor-Joining) براساس مدل Kimura 2-parameter، مدل UPGMA و Maximum parsimony و ۱۰۰۰ تکرار با استفاده از نرم‌افزار MEGA 4 رسم گردید (Kimura، ۱۹۸۰).

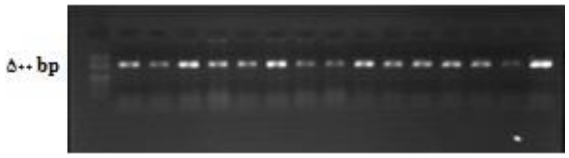
نتایج

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



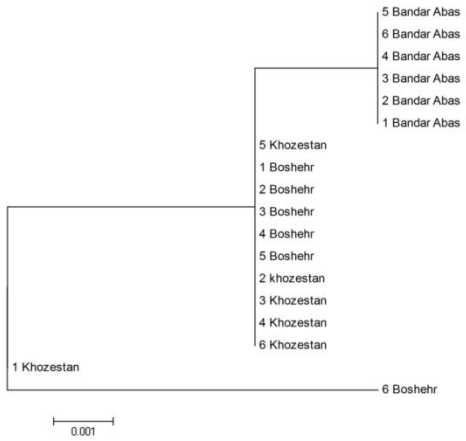
شکل ۲: الکتروفورز DNA استخراج شده

آغازگرهای ′16Sar5 و ′16Sbr3 امکان تکثیر بخشی از ژن 16S rRNA به‌طول تقریبی ۵۲۰ جفت باز را فراهم نمودند (شکل۳).



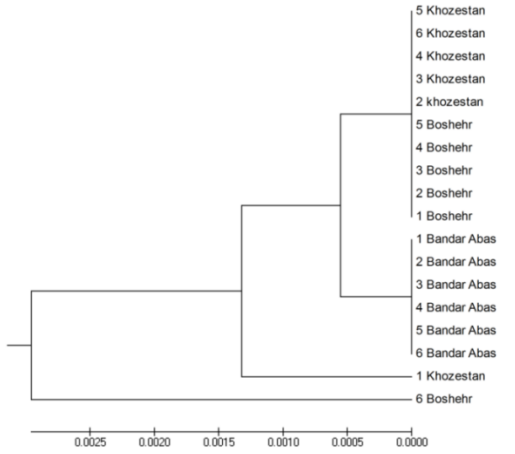
شکل ۳: الگوی باندی محصول PCR ژن 16S rRNA

ترسیم درخت فیلوژنی Neighbor-Joining به‌روش فاصله Kimura 2-parameter، وجود دو کلاستر اصلی با سه شاخه را نشان داد که نمونه‌های منطقه بندرعباس همگی در شاخه اول قرار گرفتند. در شاخه دوم نمونه‌های خوزستان و بوشهر به‌صورت مشترک قرار داشتند (شکل ۴).



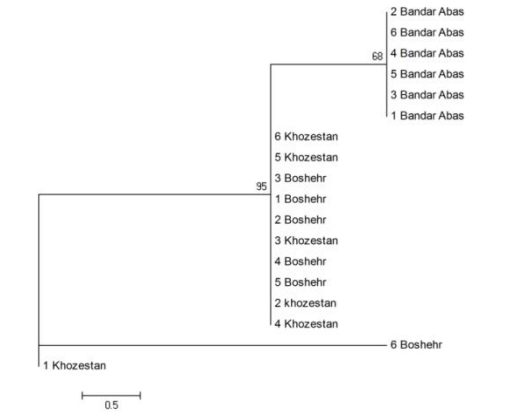
شکل ۴: درخت فیلوژنی ژن 16S rRNA میگوی سرتیز به‌روش Neighbor-Joining

در ترسیم درخت فیلوژنی به‌روش UPGMA نیز همین حالت به‌وضوح دیده شد (شکل ۵).



شکل ۵: درخت فیلوژنی ژن 16S rRNA میگوی سرتیز به‌روش UPGMA

در ترسیم درخت فیلوژنی به‌روش Maximun parsimony با ۱۰۰۰ تکرار مشخص شد که نمونه‌های بندرعباس با دقت ۶۸ درصد یک جمعیت مجزا از دو منطقه دیگر و نمونه‌های بوشهر و خوزستان با دقت بالای ۹۵ درصد یک جمعیت مشترک می‌باشند (شکل ۶).



شکل ۶: درخت فیلوژنی ژن 16S rRNA میگوی سرتیز به‌روش Maximum parsimony

تست تاجیما و Fu's FS برای ۱۸ توالی بین مناطق به‌ترتیب ۰/۸۲۳- و ۱/۱۸۱ محاسبه شد که هر دو شاخص از لحاظ آماری معنی‌دار نبودند (p>۰/۰۵)(جدول ۳).

براساس شاخص Fst که نشان‌دهنده تمایز یا جدایی جمعیت‌ها است، بیش‌ترین فاصله جمعیتی بین بندرعباس و خوزستان (۰/۷۵۰) و کم‌ترین فاصله جمعیتی بین مناطق بوشهر و خوزستان با میزان ۰/۱۰۵- دیده شد. برهمین اساس در سطح احتمال ۰/۰۵ تمایز جمعیتی منطقه بندرعباس با دو منطقه بوشهر و

خوزستان معنی‌دار (p≤۰/۰۵) و دو منطقه دیگر با یکدیگر معنی‌دار نبود (p≥۰/۰۵) (جداول ۴ و ۵).

جدول ۳: تست تاجیما و Fu's FS ژن 16S rRNA میگوی سرتیز در مناطق مورد مطالعه

آزمون	Tajima's D		Fu's FS	
منطقه	P	D	P	FS
بندرعباس	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
بوشهر	۰/۰۷	-۱/۳۳۷	۰/۸۸۱	۲/۵۹
خوزستان	۰/۱۶	-۱/۱۳۲	۰/۶۰۰	۰/۹۵۲
میانگین کل توالی‌ها	۰/۴۱۰	-۰/۸۲۳	p>۰۵	۱/۱۸۱

جدول ۴: میزان Fst براساس فراوانی هاپلوتیپی (مثلث پایین) و میزان p-value (مثلث بالا) ژن 16S rRNA

نواحی نمونه‌برداری	بندرعباس	بوشهر	خوزستان
بندرعباس	✸	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
بوشهر	۰/۵۴۵	✸	۰/۹۹۰
خوزستان	۰/۷۵۰	-۰/۱۰۵	✸

جدول ۵: ماتریکس معنی‌داری میزان Fst و میزان p-value ژن 16S rRNA میگوی سرتیز در سطح احتمال ۰/۰۵

نواحی نمونه‌برداری	بندرعباس	بوشهر	خوزستان
بندرعباس		+	+
بوشهر	+		-
خوزستان	+	-	

هم‌چنین آزمون تفاوت جمعیت‌ها (non-differentiation exact *p* values) در داخل جمعیت‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بودن تفاوت جمعیتی نمونه‌های منطقه بندرعباس با دو منطقه دیگر را مورد تأیید قرار داد (جداول ۶ و ۷). نتایج شاخص‌های Fst و آزمون تفاوت بین جمعیت‌ها در مناطق مورد مطالعه که هر دو معنی‌دار بودند (p≤۰/۰۵) باعث قبول و تأیید مجدد نتیجه وجود تفاوت بین جمعیت‌ها شد.

جدول ۶: میزان p-value آزمون تفاوت ژن 16S rRNA در جمعیت‌های میگوی سرتیز بین مناطق مورد بررسی

نواحی نمونه‌برداری	بندرعباس	بوشهر	خوزستان
بندرعباس	✸		
بوشهر	۰/۰۰۲±۰/۰۰۰	✸	
خوزستان	۰/۰۰۲±۰/۰۰۰	۱±۰/۰۰۰	✸

بحث

در تحقیق حاضر DNAهای استخراج شده دارای کیفیت قابل قبولی جهت انجام PCR بودند به‌طوری که محصول PCR روی ژل آگارز بدون آلودگی پروتئینی و یا باند اضافه مشاهده شد. استفاده از روش فنل-کلروفرم از متداول‌ترین روش‌ها در اکثر آزمایش‌های مولکولی در جهت دستیابی به DNA با وزن مولکولی و کیفیت بالا در مطالعات ژنتیک جمعیت می‌باشد (Khamnamtong و همکاران، ۲۰۰۹؛ Lester و Pante، ۱۹۹۲).

یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تفکیک جمعیت‌ها، میزان Fst می‌باشد که نشان‌دهنده جدایی بین جمعیت‌هایی است که در مناطق مختلف جغرافیایی زیست می‌نمایند. فاکتور Fst توصیف‌کننده تمایز جمعیت‌ها در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی می‌باشد و بیانگر آن است که هرچه میزان جریان ژنی بین مناطق بیش‌تر باشد اختلاف ژنتیکی کم‌تر خواهد بود. مقدار Fst به‌طور تئوری بین صفر و یک ارزیابی می‌گردد. مقدار Fst به سمت یک نشان‌دهنده میزان تمایز بالای جمعیت‌ها از یکدیگر است و مقدار کم آن نشان‌دهنده پایین بودن پلی‌مورفیسم در جمعیت است. در حقیقت مقدار صفر نشان‌دهنده یک جمعیت پانمکتیک است که دو جمعیت دارای رابطه آمیزشی آزاد هستند و مقدار یک به معنای این است که دو جمعیت کاملاً از هم جدا بوده و هیچ‌گونه جریان ژنی در بین جمعیت‌ها وجود ندارد. برطبق نظریه Wright (۱۹۷۸) اگر Fst بین صفر تا ۰/۰۵ باشد نشان‌دهنده تمایز پایین، مقدار ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط، مقدار ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تمایز بالا و مقدار بالای ۰/۲۵ تمایز خیلی بالاست. بنابراین در بررسی حاضر بر طبق نظریه Wright، تمایز جمعیتی بین مناطق بندرعباس و بوشهر (۰/۵۴۵) و بین مناطق بندرعباس و خوزستان (۰/۷۵۰) بسیار بالاست. بنابراین می‌توان استنباط نمود که جمعیت میگوی سرتیز ناحیه بندرعباس احتمالاً یک خزانه ژنی مستقل و جداگانه از دو منطقه دیگر می‌باشد. آزمون تفاوت جمعیت‌ها (non-differentiation exact p values) در داخل هر جمعیت و در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود. فاکتور Fst و آزمون تفاوت بین جمعیت‌ها که هر دو معنی‌دار بودند (p≤۰/۰۵) باعث قبول و تأیید مجدد وجود تفاوت و تمایز بین جمعیت‌ها بود.

درخت‌های فیلوژنی رسم شده نیز مسئله جدایی جمعیت منطقه بندرعباس از دو منطقه دیگر دیده شد به‌طوری‌که نمونه‌های منطقه بندرعباس در یک شاخه جداگانه قرار داشتند. درخت فیلوژنی مشخص می‌کند که احتمالاً جمعیت میگوی

سرتیز مناطق بوشهر و خوزستان مستقل نبوده و در سال‌های نه چندان دور بسط و گسترش و در واقع جریان ژنی بین جمعیت‌های این دو منطقه صورت گرفته است.

در تست تاجیما و Fu's FS، اعداد D و FS در صورت معنی‌دار بودن نشان‌دهنده بسط و گسترش جمعیت‌ها است (این دو آزمون فرض را بر این می‌گذارد که جمعیت‌ها در تعادل می‌باشند). هر دو آزمون گسترش جمعیتی (p>۰/۰۵، FS=۱/۱۸۱؛ p>۰/۰۵، D=-۰/۸۲۳) نشان دادند که بسط و گسترشی در میگوی سرتیز در سه منطقه مورد مطالعه رخ نداده است. در واقع این دو آزمون نشان دادند که جمعیت‌های میگوی سرتیز در مناطق مورد مطالعه در حال تعادل می‌باشند. درصورت تعادل بودن جمعیت‌ها یعنی این‌که جمعیت‌ها از هم تفکیک شده می‌باشند. بنابراین نتایج آزمون‌های Tajima's D و Fu's FS تأییدی بر جدایی جمعیتی میگوی سرتیز در مناطق مورد مطالعه است.

یکی از مهم‌ترین عواملی که می‌تواند در تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت دو منطقه دخالت داشته باشند وجود سدهای فیزیکی و یا گیاهی از جمله خوریات و جنگل‌های حرا در مناطق مورد بررسی می‌باشد (Xu و همکاران، ۲۰۰۱؛ Tiedemann و همکاران، ۲۰۰۰). در حقیقت جنگل‌های مانگرو که به‌صورت بسیار گسترده در ساحل شمالی خلیج‌فارس از بندر خمیر تا قشم و هم‌چنین از هرمز تا جاسک در استان هرمزگان پراکنش دارند از مهم‌ترین موانع محسوب شده در جهت ایجاد اشتقاق ژنتیکی بین جمعیت‌های میگو در این پهنه جغرافیایی با سایر مناطق محسوب می‌گردند. در این منطقه پراکنش جنگل‌های حرا زیستگاه‌های مناسبی را از جهت فراهم بودن منابع غذایی و وجود پناهگاه برای مرحله نوزادی و پست لاروی میگوها فراهم می‌آورد و نقش عمده‌ای در عدم انتقال مولدین و پست لاروها به مناطق پایین‌تر از جمله خوزستان خواهند داشت.

یکی دیگر از عواملی که سبب ایجاد جمعیت‌های جدا در یک گونه می‌شوند جدایی جغرافیایی است که مهم‌ترین عامل شکل‌گیری ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها است. بخشی از تنوع به‌وجود آمده بین جمعیت‌ها به‌علت فاصله مکانی بین جمعیت‌ها است. فاصلهٔ جغرافیایی زیاد بین جمعیت‌ها تأثیر مهمی روی ساختار ژنتیکی و جریان ژنی دارد (Wang و همکاران، ۲۰۰۸). از آن‌جا که بین مناطق مورد بررسی در تحقیق حاضر فاصله جغرافیایی زیادی وجود دارد احتمالاً از دلایل اصلی جدایی جمعیت میگوی سرتیز بین مناطق بندرعباس با دو منطقه بوشهر و خوزستان، فاصله جغرافیایی زیاد این مناطق است. با افزایش فاصله جغرافیایی فاصله ژنتیکی افزایش می‌یابد که علت آن کاهش جریان ژنی در اثر وجود موانع فیزیکی و یا طبیعی می‌باشد (Beacham و همکاران، ۲۰۰۴). اصولاً اختلاف ژنتیکی بین جمعیت‌ها در نتیجه مجتمع شدن افراد در یک منطقه خاص به‌وجود می‌آید و جمعیت‌های یک گونه به‌واسطه آمیزش درونی با یکدیگر یک مخزن ژنی منحصر به‌همان جمعیت را ایجاد می‌کنند (Pinera و همکاران، ۲۰۰۷).

مروری بر منابع نشان می‌دهد که مطالعات اندکی در مورد بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی گونه‌های مختلف آبزیان به‌خصوص سخت‌پوستان در خلیج‌فارس و دریای عمان با روش توالی‌یابی صورت گرفته است و به‌همین دلیل امکان مقایسه دقیق نتایج تحقیق حاضر با سایر مطالعات وجود ندارد. خالدی و همکاران (۱۳۹۱) تنوع ژنتیکی جمعیت ماهی راشگوی معمولی (*Eleutheronema tetradactylum*) در خلیج‌فارس و دریای عمان را به‌روش توالی‌یابی ژن 28S rRNA با جمع‌آوری ۴۱ نمونه از چهار منطقه مورد بررسی قرار دادند. براساس نتایج تحقیق، بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های بوشهر و بندرعباس به‌میزان ۰/۲۹ و بوشهر و خوزستان به‌میزان ۰/۲۸ دیده شد که نشان‌دهنده تمایز خیلی بالاست. فاصله ژنتیکی بین بندرعباس و چابهار و بین خوزستان و چابهار هم به‌میزان ۰/۲۵ و بالا ثبت شد که به وجود موانعی مانند تنگه هرمز و جریان‌های دریایی نسبت داده شد. اختلاف ژنتیکی بین بندرعباس و خوزستان هم به‌میزان متوسط ۰/۰۹ ثبت شد. در مجموع با توجه به این‌که جمعیت بوشهر با مناطق هم‌جوار خود یعنی بندرعباس و خوزستان فاصله ژنتیکی بالا نشان داده است احتمالاً متعلق به ذخیره زنتیکی واحد و جدا از جمعیت‌های دیگر می‌باشد. به‌عبارتی جمعیت بوشهر به ثبات ژنتیکی رسیده است و به اندازه سایر جمعیت‌ها پویا نمی‌باشد.

مهاجرت یک فاکتور مهم تاثیرگذار بر میزان جریان ژنی و ساختار جمعیتی است. میگوهای خانواده پنائیده اغلب در طول چرخه زندگی خود نقاط متفاوتی را جهت لانه‌گزینی انتخاب می‌کنند و مجبورند که برای کامل کردن چرخه زندگی خود دائماً بین این مناطق مهاجرت کنند. این گونه مهاجرت‌های افقی و عمودی در میگوهای خانواده پنائیده یکی از عوامل مهم در ایجاد جریان ژنی بین مناطق مورد بررسی می‌باشد. بنابراین، با توجه به نتایج تحقیق حاضر به‌نظر می‌رسد جابجایی و افزایش جریان ژنی بین جمعیت‌های بوشهر و خوزستان وجود دارد که به نسبت از تبادل ژنی بین منطقه بندرعباس و

خوزستان بیش‌تر است. احتمالاً بین جمعیت منطقه بندرعباس با جمعیت دو منطقه دیگر رفتار مهاجرت و جریان ژنی کم‌تری برقرار بوده و شاخص‌های Fst، گسترش جمعیتی و درخت فیلوژنی ترسیم شده نیز به‌وضوح تفکیک جغرافیایی بین این مناطق را نشان داد. در مطالعه ماهی راشگو نیز کم تحرکی و عدم مهاجرت این ماهیان و وجود فاصله جغرافیایی زیاد از علل تمایز بالا بین جمعیت‌های خوزستان و چابهار و بین جمعیت‌های بندرعباس و چابهار عنوان شد (خالدی و همکاران، ۱۳۹۱).

یکی دیگر از علل اصلی وجود تفاوت‌های ژنتیکی در جمعیت‌های جانداران دریایی، توانایی گسترش و پراکندگی آن‌ها است. لذا درصورتی‌که یکی از مراحل زندگی موجودات دریایی حالت پلانکتونی داشته باشد، گسترش آن‌ها ممکن است در فواصل مختلف اتفاق بیفتد (De Croos و Pálsson، ۲۰۱۰). به‌عبارت 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 می‌باشد (De Croos و Pálsson، ۲۰۱۰). دارا بودن مراحل پلانکتونی و لارو پلاژیک در آبزیان می‌تواند به جمعیت‌هایی با پراکندگی بالا و غیرمتمایز از نظر ژنتیکی در مقایسه با گونه‌هایی با فقدان مراحل پلانکتونی منجر شود (Weersing و Toonen، ۲۰۰۹). بنابراین به‌نظر می‌رسد انتشار و گسترش لارو میگوی سرتیز بین مناطق بوشهر و خوزستان به‌میزان بیش‌تری نسبت به جمعیت بندرعباس برقرار باشد که باعث تبادل آللی و جریان ژنی بیش‌تر بین این مناطق در مقایسه با جمعیت بندرعباس می‌شود.

در جمع‌بندی، از آن‌جاکه تحقیق حاضر بررسی ژنتیکی مقدماتی جمعیت میگوی سرتیز در آب‌های ساحلی بندرعباس، بوشهر و خوزستان با استفاده از توالی‌یابی ژن میتوکندریایی 16S rRNA بود ضروری است به‌منظور دستیابی به اطلاعات تکمیلی و تأیید نتایج حاصل از سایر ژن‌های میتوکندریایی یا ژنومی و تعداد بیش‌تر نمونه استفاده شود. با وجود این، اطلاعات قابل توجهی از بررسی ژنتیکی میگوی سرتیز به‌دست آمد که می‌تواند در جهت مدیریت و بهره‌برداری پایدار از ذخایر باارزش این گونه در منابع آبی و نیز در صنعت آبزی‌پروری کشور مورد استفاده قرار گیرد. نتایج اولیه نشان داد که جمعیت میگوی سرتیز منطقه بندرعباس احتمالاً یک خزانه ژنی مستقل و جداگانه از دو منطقه دیگر می‌باشد و بنابراین مدیریت برداشت و بازسازی ذخائر و هم‌چنین برنامه مولد سازی جهت تکثیر این گونه می‌بایست با در نظر گرفتن ذخائر ژنتیکی جمعیت‌های میگوی سرتیز در مناطق مورد مطالعه انجام پذیرد.

تشکر و قدردانی

از آقای مهندس فریدون چکمه‌دوز کارشناس‌ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی، بندرانزلی به‌دلیل همکاری در آنالیزهای آزمایشگاهی کمال تشکر به‌عمل می‌آید.

منابع

۱. **خالدی، ه.؛ رضوانی‌گیل‌کلایی، س.؛ ذوالقرنین، ح.؛ سواری، ا. و صفاهیه، ع.، ۱۳۹۱.** مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی در جمعیت راشگو معمولی (*Eleutheronema tetradactylum*) در خلیج فارس و دریای عمان به روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۸، شماره ۱، صفحات ۳۳ تا ۴۱.

۲. **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 persicus* با استفاده از 16S rRNA میتوکندریایی. ژنتیک نوین. دوره ۶، شماره ۲، صفحات ۲۳ تا ۳۱.

3. **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. Trans. Am. Fish. Soc. Vol. 133, pp: 1106-1126.

4. **Bruford, M.; Bradley, D. and Luikart, G., 2003.** DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nat. Rev. Genet. Vol. 3, pp: 900-910.

5. **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. Anal. Biochem. Vol. 391, No. 2, pp: 127-134.

6. **De 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. Aquat. Living Resour. Vol. 23, pp: 315-323.

7. **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. Vol. 131, pp: 479-49.

8. **8- Fu, Y.X., 1997.** Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics. Vol. 147, pp: 915-925.

9. **Khamnamtong, B.; Klinbunga, S. and Menasveta, P., 2009.** Genetic Diversity and Geographic Differentiation of the Gaint Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in

Thailand Analyzed by mitochondrial COI sequences. Biochem Genet. Vol. 47, pp: 42-55.

10. **Kimura, M., 1980.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. Vol. 16, pp: 111-120.
11. **Lester, L.J. and 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. pp: 29-52.
12. **Li, Y.L.; Kong, X.Y.; Yu, Z.N.; Kong, J.; Ma, S. and Chen, L.M., 2009.** Genetic diversity and historical demography of Chinese shrimp *feneropenaeus chinensis* in Yellow Sea and Bohai Sea based on mitochondrial DNA analysis. Afr. J. Biotechnol. Vol. 8, No. 7, pp: 1193-1202.
13. **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. 94 p.
14. **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. Mar. Biol. Vol. 151, pp: 2153-2158.
15. **Rozas, J.; Sa´nchez-DelBarrio, J.C.; Messeguer, X. and Rozas, R., 2003**. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics. Vol. 19, pp: 2496-2497.
16. **Taggart, J.B.; Hynes, R.A.; Prodohal, P.A. and Ferguson, A., 1992.** A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. J. Fish Biol. Vol. 40, pp: 963-965.
17. **Tajima, F., 1989.** Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. Vol. 123, pp: 585-595.
18. **Templeton, A.R., 2002.** The Speke's gazelle breeding program as an illustration of the importance of multi locus genetic diversity in conservation biology: response to Kalinowski et al. Conserv. Biol. Vol. 16, pp: 1151-1155.
19. **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 Res. Vol. 25, pp: 4876-4882.
20. **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. Vol. 9, pp: 1159-1163.
21. **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. Mar. Biol. Vol. 148, pp: 867-873.
22. **Wang, H.; Kesinger, J.W.; Zhou, Q.; Matrin, G. and Turner, S., 2008.** Identification and characterization of zebra fish ocular formation genes. Genome. Vol. 51, No. 3, pp: 222-235.
23. **Weersing, K. and Toonen, R.J., 2009.** Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. Mar. Ecol. Prog. Ser. Vol. 393, pp: 1-12.
24. **Wright, S., 1978.** Evolution and Genetics of Populations: Variability within and among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago. 465 P.
25. **Xu, Z.K.; Primavera, J.H.; de la Pena, L.D.; 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. Vol. 199, pp: 13-40.