ژنتیک نوین
دوره ششم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰
صفحه ۳۱-۲۳

مقایسه مولکولی اولیه *P.(penaeus) semisulcatus* خلیج-فارس و زیرگونه آن، *P.(penaeus)semisulcatus persicus* با استفاده از 16S rRNA میتوکندریایی

رویا رهنما[۱]، سیدجواد حسینی[*۲]، سیداحمد قاسمی[۳]، وحید یاوری[٤]، حسین ذوالقرنین[٥]، عباس متین‌فر[٦]

۱،۴و۵- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشیار و استادیار دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

۲و۳- به ترتیب استادیار و مربی مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس بوشهر

٦- استادیار موسسه تحقیقات شیلات ایران، خیابان فاطمی غربی، تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: fatens114@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۱)

چکیده

میگوی ببری سبز خلیج فارس، *P.(penaeus) semisulcatus* یکی از با ارزش‌ترین گونه‌های جنس Penaeus است. براساس خصوصیات ریختی، زیرگونه جدیدی از میگوی ببری سبز با نام *P.(penaeus) semisulcatus persicus* معرفی شده است. برای مطالعه تفاوت‌های ژنتیکی میان گونه و زیرگونه مذکور، 16S rRNA میتوکندریایی مورد توجه قرار گرفت. ۱۰ نمونه از گونه (۵ قطعه از سواحل بوشهر و ۵ قطعه از سواحل بندرعباس) و ۱۰ نمونه از زیرگونه (۵ قطعه از سواحل بوشهر و ۵ قطعه از سواحل بندرعباس) مورد استفاده قرار گرفتند. DNA ژنومی استخراج شده از پاهای شنای میگو به عنوان الگو استفاده شد. قطعه‌ای از ژن 16S rRNA با آغازگرهای جهانی 16Sar/16Sbr تکثیر و از هر دوطرف تعیین توالی شد. نتایج حاصل از تعیین توالی نشان داد که قطعه تکثیر شده دقیقا دارای ٥٦١ جفت باز و غنی از AT (٦٦/٤ درصد) است. همردیفی توالی-های 16S rRNA گونه از هر دو ناحیه بوشهر و بندرعباس و همچنین زیرگونه از هر دو ناحیه بوشهر و بندرعباس نشان داد که توالی‌های 16S rRNA در گونه از هر دو ناحیه بوشهر و بندرعباس دقیقا با هم مطابقت دارند. نتیجه فوق برای توالی‌های 16S rRNA زیر گونه از هر دو ناحیه بوشهر و هرمزگان نیز مشاهده شد. نتیجه هم‌ردیفی توالی توافقی 16S rRNA از گونه و زیر گونه مذکور نشان داد که ۱۸ جانشینی بازی در این دو رخ داده و نسبت جانشینی ترانزیشن به ترانسورژن ۳/۹۰٦ محاسبه شد. فاصله ژنتیکی این دو نیز براساس Kimura 2- parameter با استفاده از نرم‌افزار MEGA 4.0.2، ۳/۳ درصد محاسبه شد. فاصله ژنتیکی قابل توجه میان *P.(penaeus) semisulcatus* و زیرگونه آن، مطالعه بیشتر با استفاده ازسایر نشانگرهای ژنومیک و میتوکندریایی را مورد تاکید قرار می‌دهد.

واژه‌های کلیدی

میگوی ببری سبز، *P.(Penaeus) semisulcatus*، *P.(penaeus)semisilcatus persicus*، خلیج فارس، 16S rRNA

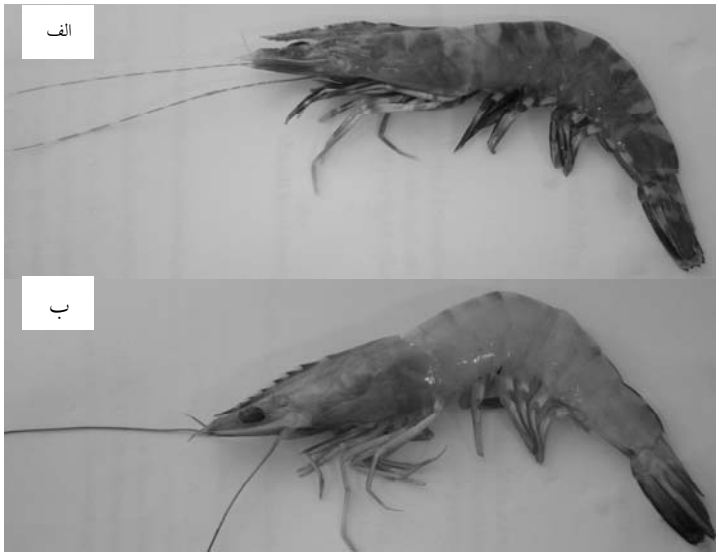
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-06]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.3.3]

مقدمه

میگوهای جنس Penaeus از متنوع‌ترین و فراوان‌ترین موجودات کف زی در آب‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری در سرتاسر جهان محسوب می‌شوند (۲۹). خصوصیات مورفولوژیکی در سطح زیادی برای شناسایی و تقسیم‌بندی سخت پوستان، خصوصا میگوها به کار گرفته شده است (۶، ۲۷). خصوصیات مورفولوژیکی مشابه و غیر قابل تشخیص علی رغم تفاوت‌های ژنتیکی، در تاکساها به عنوان گونه‌های خاموش (پنهان) تعریف می‌شوند (۱۱). تفکیک گونه‌های خاموش با توسعه نشانگرهای مناسب مولکولی (۳۰) و سایر خصوصیات بارز مثل الگوی رنگ-بندی امکان پذیر است (۱۱)

میگوی ببری سبز، *P.(penaeus) semisulcatus* De Haan (1844) به جنس Penaeus از خانواده Penaeidea تعلق دارد و یکی از با ارزش‌ترین گونهای جنس مذکور است. این گونه که اغلب آن را یکی از مرغوب‌ترین میگوهای خوراکی می‌دانند و ارزش اقتصادی بالایی دارد، بیش از ۹۰ درصد صید میگو در خلیج فارس را به خود اختصاص می‌دهد (۹). پراکنش جغرافیایی میگوی ببری سبز به عنوان یک گونه متعلق به آب‌های گرم، وسیع و پهنه آن از افریقا تا استرالیا امتداد دارد (۵). علی رغم اهمیت اقتصادی قابل توجه میگوی ببری سبز در خلیج فارس، دانش ما در مورد ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های این گونه ناچیز است. مطالعه جمعیت‌های میگوی ببری سبز خلیج فارس در ایران، برای اولین بار با استفاده از صفات مورفولوژیک و الکتروفورتیک انجام گرفت (۲). 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 شدند(۲). 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 تحت عنوان *P.(penaeus) semisulcatus persicus* معرفی شد (۲). دو تفاوت ریختی که تشخیص گونه و زیر گونه فوق را از همدیگر متمایز می‌نماید، الگوی رنگ‌بندی بدن و آنتن شلاقی است (شکل۱). 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 کرم رنگ است.



شکل۱- الگوی رنگ‌بندی بدن و آنتن شلاقی در گونه *P(penaeus).semisulcatus* (الف) و زیر گونه *P.(penaeus) persicus* (ب)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-06]

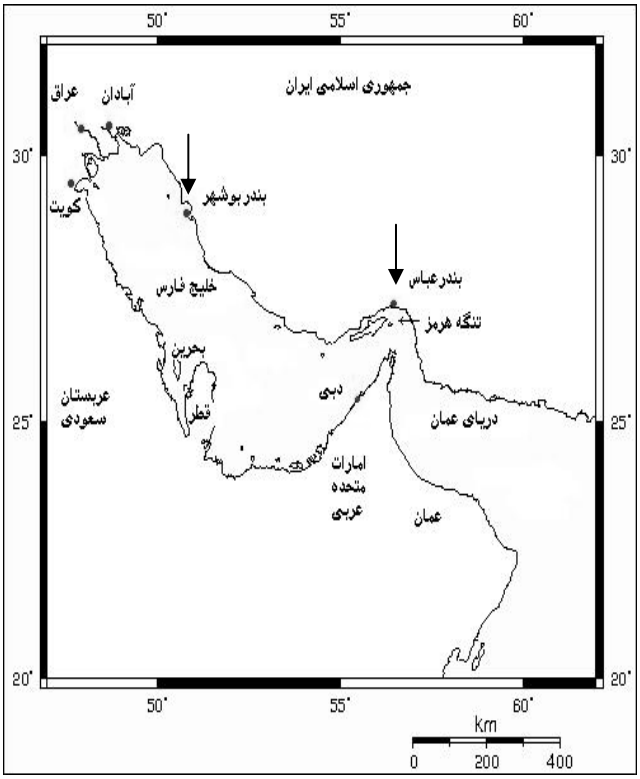
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.3.3]

سایر تفاوت‌ها عبارت از کوژ بودن روستروم در جایگاه دندانه-های ۴-۲ در گونه و عدم وجود کوژ در زیر گونه، تمایل اندک نوک روستروم به پائین در گونه و تمایل اندک آن به بالا در زیرگونه، امتداد برآمدگی حاشیه خار روستروم (adrostral crest) تا بعد از آخرین دندانه در گونه و امتداد بیشتر آن در زیر گونه است (۲). زیر گونه مذکور، میگوی غالب سواحل استان بوشهر است و در شرایط طبیعی نرخ رشد بهتری از گونه دارد (۲). شناسایی این زیر گونه براساس مطالعات ریختی و بیوشیمیایی انجام گرفته است، لذا تحقیقات مکمل مولکولی لازم و ضروری است. یکی از مارکرهای خوب DNA میتوکندری است. DNA میتوکندری به صورت گسترده به عنوان شاخص و ابزار مهمی برای مطالعه ارتباط تکاملی و تفاوت‌های ژنتیکی میگوها مورد استفاده قرار گرفته است (۸، ۱۳، ۱۹، ۲۶، ۲۷، ۳۱). انتقال مادری mtDNA و عدم وجود نوترکیبی در آن (۴) و سرعت جهش بالا در مقایسه با ژنوم هسته‌ای (۶، ۱۵، ۲۸) از دلایلی است که نشانگرهای میتوکندریایی را به ابزار مفیدی برای مطالعه جمعیت-های آبزیان بویژه میگوها تبدیل کرده است. در بین نشانگرهای میتوکندریایی، 16S rRNA سرعت پائین تکاملی از خود نشان می‌دهد و لذا برای مطالعه تمایز بین گونه‌ها مفید است (٦). از طرف دیگر، استفاده از 16S rRNA در سطح زیادی برای مطالعه رابطه فیلوژنتیک گونه‌های مختلف میگوها و سایر سخت پوستان گزارش شده (۱۳، ۲۵، ۲۶، ۲۷) و توالی‌های حاصل از تحقیقات مذکور در NCBI قابل دسترسی است. با توجه به مطالب فوق، مقایسه مولکولی اولیه گونه *P.(penaeus) semisulcatus* خلیج فارس و زیرگونه آن، *P.(penaeus) semisulcatus persicus* با استفاده از 16S rRNA در دستور کار این تحقیق قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج DNA

برای انجام این تحقیق ۱۰ قطعه از گونه *P.(penaeus) semisulcatus* (۵ قطعه متعلق به سواحل بوشهر و ۵ قطعه متعلق به سواحل بندرعباس) و ۱۰ قطعه از زیر گونه آن (*P.(penaeus) semisulcatus persicus*) (۵ قطعه متعلق به سواحل بوشهر و۵ قطعه متعلق به سواحل بندرعباس) جمع آوری شد (شکل۲). نمونه برداری در بوشهر و بندرعباس به ترتیب در شهریور و مهر ۱۳۸۷ انجام گرفت.



شکل۲- جایگاه جمع آوری نمونه‌ها در خلیج فارس

DNA بافت ماهیچه ای پاهای شنای میگو با استفاده از روش فنل/کلروفورم با اندکی تغییر (۲۱) و یا کیت استخراج DNA ژنومیک شرکت فرمنتاز مطابق با کمی تغییر در دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده، استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش‌های اسپکتوفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

تکثیر ژن *16S rRNA* میتوکندریایی

قطعه‌ای از ژن *16S rRNA* با استفاده از آغازگرهای جهانی 16Sar و 16Sbr تکثیر گردید (۲۰). جفت آغازگر استفاده شده در این تحقیق که توسط شرکت Metabion آلمان ساخته شدند دارای توالی زیر هستند:

16Sar: (5´- CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT -3´)
16Sbr: (5´- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ATG T-3´)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-06]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.3.3]

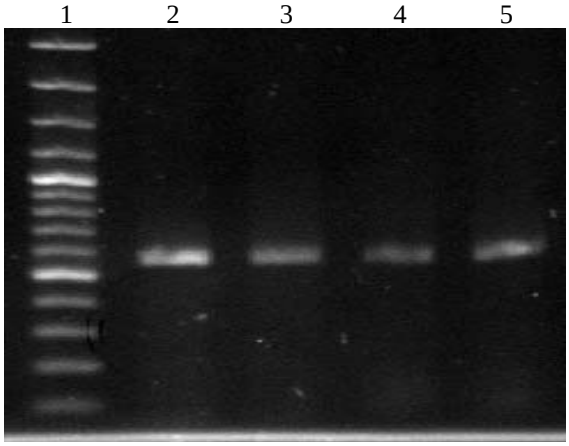
تکثیر اختصاصی بخشی از از ژن *16S rRNA* میتوکندریایی، پس از بهینه سازی شرایط واکنش، در حجم ۵۰ میکرولیتری حاوی ۴۰۰ نانوگرم از DNA الگو، ۲۰ پیکومول از هر آغازگر، ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (سیناژن)،۴۰۰ میکرومول dNTPs (سیناژن)،۳ میلی مولار $MgCl_2$ (سیناژن) و بافر PCR 1X (سیناژن) صورت گرفت. PCR طبق برنامه حرارتی ذیل انجام شد: ۹٤ درجه سانتی‌گراد (۳ دقیقه)، در طی ۳۰ چرخه ۹٤ درجه سانتی‌گراد ٤۵ ثانیه، ۵۱ درجه سانتی‌گراد ٤۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵۰ ثانیه. پس از اتمام ۳۰ چرخه، بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه ادامه یافت. سپس محصول PCR جهت مشاهده روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید.

تعیین توالی و بررسی نرم‌افزاری

۱۰ نمونه از گونه و ۱۰ نمونه از زیرگونه از هر دو ناحیه بوشهر و بندرعباس (از هر ناحیه ۵ نمونه) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی 16Sar / 16Sbr از هر دوطرف توسط شرکت SeqLab آلمان تعیین توالی گردید. صحت توال‌های هر نمونه بر اساس کروماتوگرام مربوطه با استفاده از نرم‌افزار ChromasPro 1.5 بررسی گردید. توالی کامل هر نمونه با کمک نرم‌افزارهای EditSeq و SeqMan بدست آمد. همردیفی توالی‌های حاصل از این تحقیق با استفاده از ClustalW 1.83 انجام شد (۲٤). ترکیب بازی و نسبت جانشینی ترانزیشن به ترانسورژن و فاصله ژنتیکی توالی 16S rRNA گونه و زیر گونه با روش Kimura 2-parameter (۱۰)، حذف کامل Gap، در نظر گرفتن جهش‌های ترانزیشن و ترانسورژن، سرعت یکنواخت و الگوی هموژن بین افراد بوسیله نرم‌افزار MEGA 4.0.2 محاسبه شد (۲۳). مقایسه اولیه توالی‌های حاصل از این تحقیق با توالی‌های ثبت شده در NCBI با استفاده از نرم‌افزار Blast انجام گردید (۳). توالی 16S rRNA تعدادی از گونه‌های جنس Penaeus از بانک ژنی استخراج، همردیفی آنها با توالی‌های حاصل از این تحقیق با استفاده از ClustalW 1.83 (۲٤) و با تنظیم چشمی انجام شد. فاصله ژنتیکی میان توالی‌های مذکور با روش Kimura 2-parameter (۱۰) با استفاده از نرم‌افزار MEGA 4.0.2 محاسبه شد. درخت فیلوژنتیکی بر اساس روش Neighbor – joining (NJ) با استفاده از فاصله‌های Kimura 2-parameter و با پشتوانه تکرار (bootstrap) ۱۰۰۰، حذف کامل Gap، در نظر گرفتن جهش‌های ترانزیشن و ترانسورژن، سرعت یکنواخت و الگوی هموژن بین افراد بوسیله نرم افزار MEGA 4.0.2 رسم شد (۲۳).

نتایج

آغازگرهای 16Sar و 16Sbr امکان تکثیر بخشی از ژن *16S rRNA* به طول تقریبی ۵۵۰ جفت باز را فراهم کرد. الکتروفورز محصول PCR نشان داد که قطعاتی با طول تقریبی ۵۵۰ جفت باز از ژن *16S rRNA* از همه نمونه‌های جمع‌آوری شده با موفقیت تکثیر شده است. شکل۳ الگوی حرکتی محصول PCR را در تعدادی از نمونه‌ها (نمونه شماره ۱تا ۴ زیرگونه از بندرعباس) نشان می‌دهد.



شکل ۳- الگوی حرکتی محصول PCR ژن *16S rRNA* در تعدادی از نمونه‌ها: ۱- مارکر100bp. ۲ تا ۵- به ترتیب نمونه‌های شماره ۱ تا ۴ زیر گونه از بندر عباس

نتایج حاصل از تعیین توالی محصول فوق نشان داد که قطعه تکثیر شده از تمام نمونه‌ها دقیقا ۵٦۱ جفت باز طول دارد. در یک مطالعه اولیه همردیفی توالی‌ها با استفاده از ClustalW 1.83 انجام شد. همردیفی توالی‌های 16S rRNA گونه از هر دو ناحیه بوشهر و بندرعباس نشان داد که این توالی‌ها در دو ناحیه مذکور دقیقا با هم مطابقت دارند. همچنین در زیر گونه نیز توالی‌های 16S rRNA از هر دو ناحیه بوشهر و بندرعباس دقیقا با هم مطابقت دارند. ولی این توالی‌ها در گونه و زیر گونه تفاوت دارند. سپس

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-06]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.3.3]

توالی توافقی ژن *16S rRNA* از گونه و توالی توافقی ژن *16S rRNA* زیر گونه حاصل از این تحقیق در NCBI، به ترتیب با کد دسترسی GU573957.1 و .GU573956 ثبت گردید. ترکیب بازی توالی‌های فوق غنی از AT (٦٦/٤ درصد) است. نتیجه همردیفی توالی 16S rRNA از گونه و زیر گونه مذکور نشان داد که ١٨ جانشینی بازی رخ داده است (شکل ٤). نسبت جانشینی ترانزیشن به ترانسورژن با استفاده از نرم افزار MEGA، ٣/٩٠٦ محاسبه شد. فاصله ژنتیکی این دو نیز براساس Kimura 2- parameter، ٣/٣ درصد محاسبه شد.

توالی‌های 16S rRNA حاصل از این تحقیق، با گونه‌های *P.(marsupenaeus)japonicus* (EU056321)، *P.(fenneropenaeus)indicus* (FJ002574/1)، *P.(fenneropenaeus)merguensis* (AY143984/1)، *P.(penaeus)semisulcatus* (AY744267/1)، *P.(penaeus)monodon* (EU105473/1) و *P.(litopenaeus)vannamei* (AY344186/1) مقایسه شد (توالی 16S rRNA میگوی ببری سبز با کد دسترسی AY744268/1 دارای ۴۶۷ جفت باز است و به وسیله محققان هندی گزارش شده است). گونه مورد مطالعه این تحقیق *P.(penaeus) semisulcatus* است و چون توالی ژن *16S rRNA* که در NCBI ثبت شده دارای ٤٦٧ جفت باز است؛ لذا با استفاده از همردیفی اولیه و مشاهدات چشمی، دقیقا قطعه‌ی ٤٦٧ جفت بازی 16S rRNA ازتحقیق حاضر (در این جا گونه با توجه مکان جمع‌آوری نمونه و معادل انگلیسی خلیج فارس با نام *P.(penaeus) semisulcatus*PG نشان داده شده است) و همه گونه‌های فوق برای بررسی فیلوژنتیکی مورد توجه قرار گرفت. نتایج همردیفی، ٨١ جایگاه متنوع و ٣٦ جایگاه با اطلاعات فیلوژنتیک در شرایط پارسیمونی نشان داد. توالی‌های فوق غنی از AT (۶۶/۹ درصد) ونسبت جانشینی ترانزیشن به ترانسورژن به طور متوسط ١/٣٢٨ محاسبه شد. جدایی ژنتیکی میان توالی‌های فوق بسیار متنوع و از ٠/٠١١ میان *P.(marsupenaeus) japonicus* و *P.(penaeus) semisulcatus* تا ٠/١٢٥ میان *P.(penaeus)semisulcatus* و *P.(litopenaeus) vannamei* محاسبه شد (جدول١). فاصله ژنتیکی متوسط نیز ٠/٠٧٠ محاسبه گردید. همان طور که جدول نشان می‌دهد بر اساس ناحیه ۴۶۷ جفت بازی توالی 16S rRNA، میگوی ببری سبز خلیج فارس (حاصل از این تحقیق) و میگوی سبز از هند تفاوتی با هم ندارند، در صورتی که تفاوت میان گونه فوق و زیر گونه آن قابل توجه (٠/٠٤٠) است. درخت فیلوژنتیکی بر اساس آنالیز Neighbor-joining با استفاده از فاصله Kimura 2- parameter رسم شد (شکل۵). درخت رسم شده بر اساس آنالیز فوق موید داده‌های جدول یک است.

```
psper CGCCTGTTTA ACAAAAACAT GTCTATATGA TTGTTATATA AAGTCTAGCC TGCCCACTGA TTAGAATTTA
psem  .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..GA......

psper AAGGGCCGCG GTATACTGAC CGTGCGAAGG TAGCATAATC ATTAGTCTTT TAATTGAAGG CTTGTATGAA
psem  .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..C.......

psper TGGTTGGACA AAAAGTAAGC TGTCTCAGTT ATAAGTATTG AACTTAACTT TTAAGTGAAA AGGCTTAAAT
psem  .......... .......... .......... ....TA.... ..T....... .......... ..........

psper GAATTAAGGG GACGATAAGA CCCTATAAAG CTTGACAATA AGTCAATTAT ATTATAAATT GTTAGTGTAA
psem  .G....G... .......... .......... .......... ...T...... .......... ......A...

psper CTTGATTTTA ATTGGCATTT GTTACGTTGG GGCGACGAGA ATATAATGAG TAACTGTTTT TAAATATTTA
psem  .......... ....A.G... .......... .......... .......... ........C. ....C.....

psper ATAACAAATA TAGTTGGTAT TTTATTGATC CTTTATTAAA GATTAAAAGA TTAAGTTACT TTAGGGATAA
psem  ..G....... ..A....... ..G....... .......... .......... .......... ..........

psper CAGCGTGATC TTCTTTGAGA GTTCATATCG ACAAGAAGGT TTGCGACCTC GATGTTGAAT TAAGGTATCC
psem  ......A... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

psper TTATGATGCA GCAGTTATAA AGGAAGGTCT GTTCGACCTT TAAATCCTTA CATGATCTGA GTTCAGACCG
psem  .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

psper G
psem  .
```

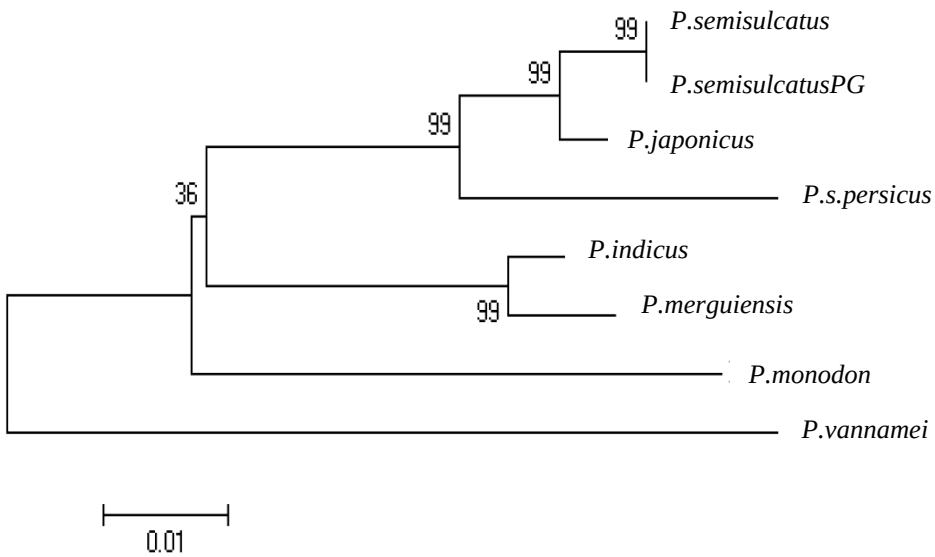
شکل۴- همردیفی بخشی از توالی 16S rRNA در گونه (Psem) و زیر گونه (Psper).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-06]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.3.3]

جدول۱- فاصله ژنتیکی میان *P.semisulcatusPG* و *P.semisulcatus persicus* و تعدادی از گونه‌های جنس Penaeus بر اساس بخشی از ژن *16S rRNA*.

	1	2	3	4	5	6	7
1. P.indicus							
2. P.japonicus	0.063						
3. P.merguiensis	0.013	0.070					
4. P.monodon	0.073	0.072	0.075				
5. P.semisulcatus	0.066	0.011	0.073	0.080			
6. P.semisulcatusPG	0.066	0.011	0.073	0.080	0.000		
7. P.s.persicus	0.075	0.038	0.070	0.092	0.040	0.040	
8. P.vannamei	0.106	0.109	0.111	0.119	0.109	0.109	0.125



شکل۵- درخت فیلوژنی برای تعدادی از گونه‌های Penaeus و نمونه‌های حاصل از این تحقیق به کمک تجزیه Neighbor-joining توالی‌های ژن *16S rRNA*. درخت فیلوژنتیک مشابه بر اساس Maximum parsimony نیز بدست آمد.

بحث

میگوی ببری سبز خلیج فارس، *P.(penaeus) semisulcatus* ارزش اقتصادی بالایی دارد و بیش از ۹۰ درصد صید میگو در خلیج فارس را به خود اختصاص می‌دهد (۹). بر اساس خصوصیات ریختی، الگوی رنگ‌بندی بدن و آنتن شلاقی میگوی ببری سبز، دو واریته از این گونه - که یکی از آنها به عنوان زیرگونه در نظر گرفته شده - معرفی شده است (۲). با استفاده از آزمایش دقیق الگوی رنگ بدن، تعدادی از گونه‌های خاموش در ده پایانی از قبیل، میگوهای خانواده Pontoniinae مانند *Periclimenes inranatus* و *Periclimenes oranatus* (۲۷)، گونه‌های *Uca specios* و *Uca spinicarpa* از خرچنگ‌های پهن ویولون زن (۱۸)، میگوهای نقب زن گونه‌های Alpheus (۱۲) و دو واریته متفاوت از گونه *P. japonicus* (۲۶، ۲۷) به صورت موفقیت آمیز از هم دیگر تفکیک شده‌اند. اگر چه الگوی رنگ بدن یک ویژگی خوب برای تفکیک گونه‌های خاموش در ده پایان فراهم نموده (۱۱) و نسبتا معیار دقیقی است، ولی معمولا در رده بندی ده پایان مورد توجه قرار نمی‌گیرد، زیرا در گونه‌ها بسیار متنوع است (۲۷) و در زمان ذخیره سازی آنها در فریزر، از دست می‌رود (۱۱). با استفاده از آزمایش دقیق

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.3.3]

الگوی خاص رنگ بدن و وجود آنتن شلاقی مخطط، گونه و زیر گونه میگوی ببری سبز به راحتی از همدیگر قابل تشخیص هستند. چنین الگوی رنگی قبلا نیز برای افراد این گونه در آب-های خلیج فارس و دریای عمان گزارش شده بود (۱). قبلا گونه اصلی به میگوی آنتن بنددار و گروهی که امروزه به عنوان زیر گونه معرفی شده‌اند به میگوی آنتن بدون بند معروف بودند (۱).

نتیجه این تحقیق ارتباط قوی میان ژنوتیپ و الگوی رنگ بندی در نمونه‌های جمع‌آوری شده در سواحل استان بوشهر و سواحل استان هرمزگان بر اساس توالی ژن *16S rRNA* را تایید می‌کند. همردیفی اولیه ژن *16S rRNA* گونه از بوشهر و بندرعباس با همدیگر و همچنین همردیفی اولیه ژن *16S rRNA* زیرگونه از دو منطقه حاکی از عدم تلاقی گونه و زیر گونه است. بر اساس قطعه ۵۶۱ جفت بازی، تفاوت میان گونه و زیرگونه ۳/۳ درصد محاسبه گردید، اما براساس قطعه ۴۶۷ جفت بازی این تفاوت به ۴ درصد افزایش یافت. نتیجه فوق بیانگر آن است که اکثر جانشینی‌های بازی در ناحیه ۴۶۷ جفت بازی متمرکز است. جانشینی بازها در بین گونه و زیر گونه بیشتر از نوع ترانزیشن بود (۳/۹۰۶). در تحقیق مشابه نسبت ترانزیشن به ترانسورژن برای گونه‌های جنس Metapenaeopsis به طور متوسط ۳/۳ گزارش شده است (۲۵).

مقایسه تفاوت ژنتیکی توالی‌های 16S rRNA حاصل از این تحقیق و سایر گونه‌های جنس Penaeus با همدیگر حاکی از تفاوت ژنتیکی بسیار کم (۱/۱ درصد) میان *P.(penaeus) semisulcatus* و *P.(marsupenaeus) japonicus* و تفاوت ژنتیکی بیشتر میان *P.(penaeus) monodon* و *P.(penaeus) semisulcatus* است (جدول۱). داده حاصل از این تحقیق، با نتایج سایر محققان در تضاد است. مثلا بر اساس آنالیز ماکزیموم لیکلیهود ارتباط ژنتیکی بیشتری میان *P. (penaeus) monodon* و *P.(penaeus) semisulcatus* مشاهده شده است (۱۳). تفاوت در نتایج را می‌توان به وجود تفاوت در نواحی آنالیز شده و پارامترهای در نظر گرفته شده برای آنالیزتوالی‌ها با استفاده از نرم-افزارهای موجود نسبت داد.

آغازگرهای 16Sar و 16Sbr برای تکثیر و بررسی رابطه تکاملی سایر گونه‌های جنس Penaeus مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در تحقیقات مشابه تفاوت ژنتیکی دو واریته مشابه مورفولوژیکی از گونه *P.(marsupenaeus) japonicus* با استفاده از 16S rRNA، یک درصد گزارش شده است. از طرف دیگر مطالعات فیلوژنتیکی نشان داد که این دو واریته نسبت به سایر گونه‌های جنس Penaeus به هم نزدیک‌تر هستند و لذا این دو واریته به عنوان گونه‌های خاموش در نظر گرفته شده است (۲۷). بر اساس توالی ژن *16S rRNA* دو گونه *P.(fenneropenaeus) silasi* و *P.(fenneropenaeus) penicillatus* فاقد تفاوت ژنتیکی بودند (۱۳). بر اساس 16S rRNA برای چند گونه از جنس Metapenaeopsis، متوسط تنوع ژنتیکی ۶/۴ درصد گزارش شده است (۲۵). توجه به مطالب فوق و نتایج بدست آمده از این تحقیق (جدول۱) حاکی از آن است که تفاوت مشاهده شده میان گونه و زیر گونه براساس 16S rRNA، قابل توجه است.

زمان جدایی واریته متفاوت از گونه *P.(marsupenaeus) japonicus* که به عنوان گونه خاموش معرفی شده است (۲۶) بر اساس الگو گرفتن از سرعت جدایی ژن *16S rRNA* در خرچنگ-های پهن (۲۲) تخمین زده‌اند. در خرچنگ‌های پهن سرعت جدایی 16S rRNA، ۰/۹ درصد در میلیون سال تخمین زده شده است (۲۲). بر اساس داده‌های فوق زمان جدایی میگوی ببری سبز و زیرگونه آن را می‌توان ۲/۹۷ میلیون سال پیش تخمین زد.

میگوهای خانواده پنائیده علی رغم اختلافات ژنتیکی قابل ملاحظه، دارای شباهت‌های فنوتیپی (مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و اکولوژیکی) زیاد هستند (۱۳، ۱۵، ۱۷). این در حالی است که در مطالعات مشابه، بز و گوسفند و یا انسان و شامپانزه با وجود اختلافات ظاهری فراوان جدایی ژنتیکی کمتری دارند. این مطلب حاکی از آن است که نسبت میان تکامل مورفولوژیکی و مولکولی برای میگوهای خانواده پنائیده و دیگر موجوداتی مثل پستانداران متفاوت است. احتمالا یک عامل پایدار کننده روی شکل ظاهری و ویژگی‌های اکولوژیکی موثر است و به نظر می‌رسد شرایط دریایی یکی از عوامل ثبات خصوصیات مورفولوژیکی است. لذا، احتمالا تفاوت‌های مولکولی به صورت معمول ظاهر می‌شوند، ولی به دلیل ثبات بیشتر خصوصیات مورفولوژیک در مقایسه با سایر موجودات، تفاوت‌های مولکولی بزرگتر به نظر می‌رسند

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-06]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.3.3]

(۱۷). تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت‌های جانداران دریایی، بطور مستقیم وابسته به توانایی گسترش و پراکندگی آنها است، زیرا بجز جریان‌های دریایی یک طرفه، محیط‌های دریایی موانع فیزیکی برای جلوگیری از مهاجرت فراهم نمی‌کنند. لذا در صورتی که یکی از مراحل زندگی موجودات دریایی حالت پلانکتونی داشته باشد، گسترش آنها ممکن است در فواصل مختلف اتفاق افتد (۱۴). یکی از عوامل گونه‌زایی، مهاجرت به مکان‌های دیگر و تغییرات تدریجی طی صدها هزار سال است.

به عنوان مثال، گونه‌های *P.(farfantepenaeus) aztecus*، *P.(farfantepenaeus) dourarum* و *P.(litopenaeus) setiferus* از اعضای اولیه خلیج مکزیک هستند. گونه‌های *P.(farfantepenaeus) subtilis* و *P.(farfantepenaeus) notialis* قبلا به ترتیب زیر گونه‌های *P.aztecus* و *P.dourarum* محسوب می‌شدند و نام آنها *P.aztecus subtilis* و *P.dourarum notialis* بود. فرض بر این است که گونه‌های *P.(farfantepenaeus) aztecus*، *P.(farfantepenaeus) dourarum* از خلیج مکزیک به دریای کارائیب مهاجرت کرده و این گونه‌زایی در آن جا رخ داده است (۱۴).

با توجه به مطالب فوق می‌توان الگوی زیر را برای تفاوت‌های مورفولوژیکی و ژنتیکی میان میگوی ببری سبز و زیر گونه آن ارائه نمود:

میگوی ببری سبز از طریق اقیانوس هند وارد دریای عمان و از آنجا از طریق تنگه هرمز وارد خلیج فارس شده و به تدریج به سمت منطقه شمالی خلیج فارس در استان بوشهر مهاجرت نموده است. با توجه به تفاوت‌های اکولوژیکی (شوری و درجه حرارت) خلیج فارس در سواحل استان بوشهر در مقایسه با سواحل استان هرمزگان، ممکن است گونه میگوی ببری سبز به تدریج تغییر ماهیت داده تا به شکلی که امروز تحت عنوان *P.(penaeus) semisulcatus persicus* می‌شناسیم تبدیل شده است.

سوالی که مطرح می‌گردد این است که آیا *P.(penaeus) semisulcatus persicus* – که در اینجا به عنوان زیر گونه در نظر گرفته شده است – در حقیقت جمعتی جدا از *P.(penaeus) semisulcatus* است یا می‌توان آن را به عنوان یک گونه خاموش محسوب کرد؟ بعضی دانشمندان بعد از جدایی تولید مثلی، داشتن یک تفاوت مشخص مورفولوژیکی و مولکولی را برای تشخیص گونه کافی می‌دانند (۱۶). لذا مطلب مذکور، لزوم تحقیقات بیشتر مولکولی با استفاده از نشانگرهای ژنومیک و سایر نشانگرهای میتوکندریایی را مورد تاکید قرار می‌دهد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه خلیج فارس جهت تامین هزینه این طرح پژوهشی ابراز می‌دارند.

منابع

۱. شکوری م(۱۳۷۳) میگوی ببری سبز: طبقه بندی، نام ها و پراکنش جغرافیایی. مجله آبزی پرور، تابستان سال چهارم، صفحات ۴ تا ۷.

۲. متین فر ع (۱۳۷۸) بررسی و تعیین گونه ای وشناسایی جمعیت های میگوی ببری سبز در آب های شمالی خلیج فارس. پایان نامه دوره دکتری دانشگاه آزاد اسلا می، واحد علوم و تحقیقات تهران.

3. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Miller W, Lipman DJ (1977) Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acid Res 25:3389-3402.

4. Bouchon D and Souty-Grosset C , Raimond R (1994) Mitochondrial DNA variation and markers of species identy in two penaeid shrimp species: *penaeus mondon* and *p. japanicus.* Aquaculture 127: 131-144.

5. Burkovskii R N (1982) Key to shrimp and lobsters. Oxonian Press, New Delhi: 31-32.

6. Calo-Mata P and Pascoal A , Fernandez I, Bohme K, 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., 123- 133

7. Chu K H and Li C P , Tam K Y , Lavery S. (2003) Application of mitochondrial control region in population genetic studies of the shrimp *penaeus.* Molecular Ecology Notes 3:120-122.

8. Gai Y H and Song D X, Sun H Y, Zhou K Y (2008) The complete mitochondrial genom of *Symphylella* sp.(Myriapoda:Symphyla): Extensive gene order rearrangement and evidence in favor of Progoneata. Molecular phylogeny and Evolution 49: 547-585.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-06]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.3.3]

9. Hosseini S J and Elahi E, Raie M (2004) The chromosome number of the Persian Gulf shrimp *Penaeus semisulcatus*. Iranian Int. J. Sci, 5:13-23
10. 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
11. Knowlton N (1986) Cryptic and sibling species among the decapod Crustacea. Crustac. Biol. 6: 356-365.
12. Knowlton N and Keller B D (1983) A new, sibling species of snapping shrimp associated with the Caribbean sea anemone Bartholomea annulata. Bull Mar Sci 33:353-362.
13. Lavery S and Chan T K , Tam YK, Chu K H (2004) Phylogenetic relationship and evolutionary of the shrimp genus *Penaeus s.l.* drived from mitochondrial DNA. Molecular Phylogenetics and Evolution 31:39-49.
14. Lester, L.J., 1979. Population genetic of penaeid shrimp from the Gulf of Mexico. Heredity 70, 175-180.
15. Liu ZJ and Cordes J F (2004) DNA marker technological and their applications in aquaculture genetics. Aquaculturer 238: 1-37.
16. Mink, D.G., Sites, J.W., 1996. Species limits, phylogenetic relationship and origin of viviparity in the the Scalaris complex of the lizard genus *Scloporus* (phrynosomatidae). Herpetological 52, 551-557.
17. Palumbi S R and Benzie J (1991) Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1:27–34.
18. Salmon M, Ferris SD, Johnston D, Hyatt G, Whitt GS (1979) Behavioral and biochemical evidence for species distinctiveness in the fiddler crabs. Uca speciosa and U. spinicarpa. Evolution 33:182-191
19. Shen X and Ren J , Cui Z , Wang B(2007) The complete mitochondrial genomes of two common shrimps(*Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis*) and their phylogenomic considerations. Gene 403:98-109.
20. Simon C and Franke A , Martin A (1991) The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification. In: Hewitt GM, Johnson AWB and Young JPW (eds), Molecular Techniques in Taxonomy. Springer-Verlag, Berlin, pp 329-355.
21. Sombbrook J and Russell W (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold spring Laboratory press.
22. Sturmbauer Cand Liventon J, Christy J (1996) Molecular phylogeny analysis of fidder crabs: test of the hypothesis of increasing behavioral complexity in evolution. Proc Natl Acad Sci USA 93:10855-10857.
23. Tamura K and Dudley J, Nei M & Kumar S **(**2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.
24. Thompson, J D and Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G (1994) The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24: 4876–4882.
25. Tong JG and Chan TY , Chu KH (2000) A Perliminary Phylogenetic Analysis of Metapenaeopsis (Decapoda:Penaeidae) Based on Mitochondrial DNA Sequences of Selected Species From The Indo-West Pacific. Journal of Crustacean Biology, 20(3): 541-549.
26. Tsoi KH and Wang Z Y, Chu, KH (2007) Molecular population structure of the kuruma shrimp *Penaeus japonicus* species complex in western pacific. Marin Biology, 150: 1345-1364.
27. Tsoi KH and Wang Z Y, Chu, KH (2005) Genetic divergence between two morphological similar varieties of the kuruma shrimp *Penaeus japonicus*. Marine Biology 147: 367-379.
28. Valles – Jimenex R and Gaffney P M , Perez – Eniquez R (2006) RFLP analysis of the mtDNA control region in white shrimp (Litopenaeus vannamei) population from the eastern pacific. Marine Biology148: 867-873.
29. Voloch C M and Freir P R, Russo C A M (2005) Molecular phylogeny of penaeid shrimps inferred from two mitochondrial markers. Genet. Mol. Res. 4:668-674.
30. Williams ST and Knowlton N, Weigt LA, Jara JA (2001) Evidence for three major clades within the snapping shrimp genus *Alpheus* inferred from nuclear and mitochondrial gene sequence data. Mol Phylogenet Evol 20:375–389
31. Wilson K and Cahill V, Ballment E, Benzie J (2000) The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: are malacostracan crustacean more closely related to insect than to branchiopods. Mol.Biol.Evol.:863-874.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.3.3]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.3.3]
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-06]