بررسی تنوع ژنتیکی میگوی سفید (*Metapenaeus affinis*) در سواحل خلیج فارس (استان خوزستان) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای

مریم شکوهمند [۱]*؛ حسین ذوالقرنین [۲]؛ فرامرز لالوئی [۳]؛ علی محمد فروغمند [٤] و احمد سواری [٥]

shokoohmand_sa@yahoo.com

۱،۲و۵- دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ٦٦٩

۳- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری صندوق پستی:٩٦١

٤- گروه ژنتیک دانشگاه شهید چمران، اهواز

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۰

چکیده

به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت های میگوی سفید (*Metapenaeus affinis*) در سواحل خلیج فارس با استفاده از روش ریزماهواره، ۶۰ نمونه از بافت عضله شنای میگو، از مناطق بحرکان و لیفه - بوسیف استان خوزستان در پاییز ۱۳۸۶ جمع‌آوری شد. DNA ژنومی نمونه‌ها به روش استات آمونیوم استخراج و سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. واکنش PCR با استفاده از ۵ جفت آغازگر ریزماهواره انجام گرفت. محصول PCR با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد الکتروفورز و با رنگ آمیزی نیترات نقره مشاهده گردید. مقدار فراوانی آللی، تعداد آلل‌های واقعی و موثر، هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، میزان شباهت و فاصله ژنتیکی، تعادل هاردی- واینبرگ، مقادیر F_{st} و R_{st} و جریان ژنی براساس آزمون AMOVA با استفاده از نرم افزار ژنتیکی Gene Alex و Pop Gene محاسبه گردید. نتایج بدست آمده از این بررسی نشان داد که هر ۵ جایگاه ریزماهواره‌ای بررسی شده پلی مورف بودند. میانگین تعداد آلل مشاهده شده و موثر بترتیب ۷ و ۳/۷ بود و میانگین هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار بترتیب ۰/۲۷ و ۰/۶۶محاسبه شد. در بررسی تعادل هاردی- واینبرگ مناطق بحرکان و لیفه - بوسیف در تمامی جایگاه‌های مورد بررسی خارج از تعادل هاردی- واینبرگ بودند. براساس تست AMOVA میزان F_{st} و R_{st} و جریان ژنی(N_m) بین مناطق مورد بررسی بترتیب ۰/۱۰۷، ۰/۳۷۲ و ۲/۰۹۲ بود. بیشترین فاصله ژنتیکی بین مناطق نمونه‌برداری شده، ۰/۵۶۱ و کمترین شباهت ژنتیکی ۰/۵۷۱ بود. با توجه به نتایج بدست آمده و وجود تفاوت ژنتیکی بین نمونه‌ها، می‌توان عنوان نمود که جمعیت واحدی از میگوی سفید در مناطق مورد بررسی وجود نداشته و بطور کلی دو گروه ژنتیکی متفاوت در مناطق بحرکان و لیفه- بوسیف زیست می‌کنند.

لغات کلیدی: ژنتیک جمعیت، تنوع، *Metapenaeus affinis*، خلیج فارس

*نویسنده مسئول

مقدمه

تغییرات شرایط اقلیمی و جغرافیایی طی سالهای متمادی بر جمعیت‌های آبزیان تاثیر گذاشته و سبب تغییرات، تنوع ژنتیکی یا انقراض گونه‌ها گردیده است. اعمال مدیریت صحیح بر ذخایر آبزیان و توسعه آبزی‌پروری زمانی با موفقیت همراه خواهد بود که شناسایی ذخایر ژنتیکی گونه‌های بومی منطقه مورد مطالعه قرار گیرد. اولین گام در این زمینه شناخت صحیح گونه‌ها، جمعیتها و نژادها می‌باشد.

میگوهای خانواده پنائیده در آبهای استوایی و نیمه استوایی در سراسر جهان یافت می‌شوند، میگوها از آبزیان با ارزش و اقتصادی خلیج فارس و دریای عمان می‌باشند که از ارزش غذایی بسیار بالایی برخوردارند. یکی از گونه‌های مهم میگوی پنائیده، میگوی سفید (*Metapenaeus affinis*) می‌باشد که از لحاظ خصوصیات زیست‌شناسی راستروم دارای ۸ تا ۱۱ دندانه بوده و با یک برگشتگی اندک به پای سومی شاخک حسی رسیده یا از آن می‌گذرد. رنگ بدن زرد کمرنگ متمایل به سبز یا قرمز بوده و در بعضی از مواقع نمونه‌های سبز متمایل به آبی یا صورتی متمایل به قهوه‌ای یافت می‌شود. شاخک‌های حسی قرمز رنگ بوده و پاهای حرکتی سفید یا همرنگ می‌باشد. پاهای شنا نیز دارای طیف رنگی قرمز تا سفید می‌باشد. رنگ نوک اندام یوروپاد معمولاً سفید یا زرد متمایل به سبز می باشد (FAO, 1985).

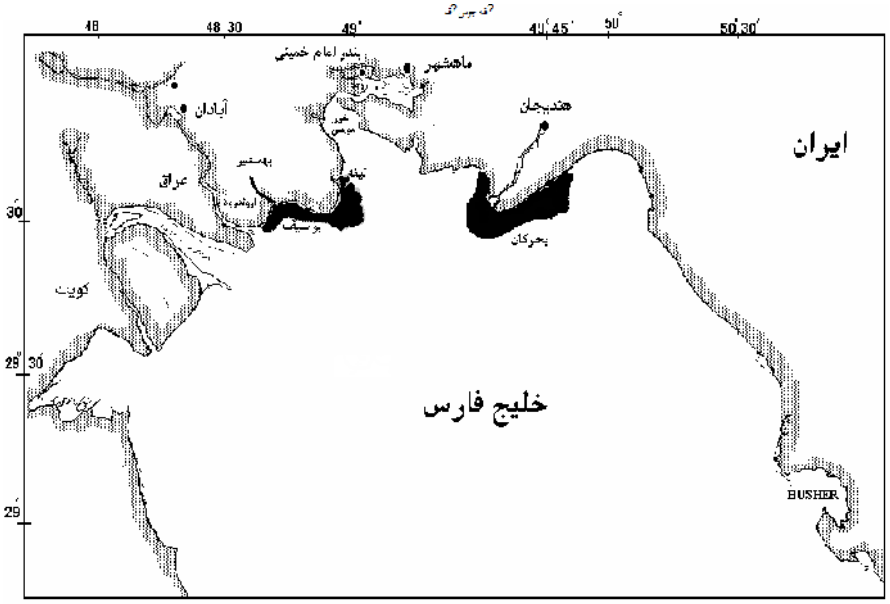
میگوی سفید در آبهای خلیج فارس و دریای عمان تا آبهای جنوبی هند و همچنین در آبهای سریلانکا وجود دارد. پراکنش بیشتر آنها در شرق تا آبهای فیلیپین و جزیره تایوان نیز ادامه می‌یابد (FAO,1985). پراکنش میگوی سفید در خلیج فارس در مناطق خوزستان، بوشهر و هرمزگان می‌باشد.

این گونه در استان خوزستان در دو زیستگاه دریا (سواحل) و خوریات زیست می‌کند که مهمترین آن زیستگاههای غربی (لیفه –بوسیف)، زیستگاههای شرقی (بحرکان)، خوریات منطقه ماهشهر و بندر امام می‌باشد (نیامیمندی، ۱۳۷۲). میگوی سفید بالغ یکی از اجزاء اصلی مهاجر فون خورها است. میگوهای بزرگ مهاجرت نموده در حالیکه میگوهای ریز در خورها می‌مانند. رشد میگوها زمانی رخ می‌دهد که میگوها در خورها بسر می‌برند. میگوی سفید بالغ تا مرحله جوانی در سواحل خورها باقی مانده سپس این زیستگاه را به سمت اعماق ترک می‌کند. درجه حرارت بعنوان عامل مهم در مهاجرت مجدد میگو به مناطق دور از ساحل محسوب می‌شود (Garcia, 1984). با وجود اینکه اطلاعات فیزیولوژیک زیادی در ارتباط با میگوهای خانواده پنائیده وجود دارد، تحقیقات کمی در مورد نسبتهای خویشاوندی و جمعیتی در این گروه با اهمیت انجام شده است که از آن جمله می‌توان به گزارش‌های زیر اشاره نمود (Baldwin *et al*.,1998).

بررسی تنوع ژنتیکی میگوی ببری (*Penaeus monodon*) در فیلیپین با استفاده از روش میکروستلایت (Xu *et al*., 2001) و بررسی تنوع ژنتیکی میگوی ببری (*Penaeus monodon*) در ۵ منطقه جغرافیایی در تایلند (Supugul *et al*., 2000). با توجه به اینکه تاکنون مطالعاتی در مورد تنوع ژنتیکی جمعیت‌های احتمالی میگوی سفید در خلیج فارس با استفاده از نشانگر ریزماهواره صورت نگرفته است، لذا این بررسی با هدف شناسایی جمعیت‌های احتمالی میگوی سفید با استفاده از نشانگر ریزماهواره در استان خوزستان انجام شده است.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری از دو منطقه سواحل شرقی و غربی خلیج فارس در استان خوزستان که در فاصله ۸۴ کیلومتری از یکدیگر قرار دارند، صورت گرفت. صید نمونه‌ها با استفاده از تورهای ترال انجام شد. در این بررسی تعداد ۳۰ نمونه میگو از منطقه بحرکان در عمق ۱۴-۸ متر (با مختصات ۲۹۵۴/۹۹۵/۴۹۲۹/۲۵۶۰ و ۲۹۵۵/۸۳۸/۴۹۳۱/۸۸۲) و ۳۰ نمونه از منطقه لیفه - بوسیف در عمق ۳-۲ متر (با مختصات ۳۰۰۲/۳۷۷/۴۵۵۸/۹۶۹ و ۳۰۰۵/۷۹۷/۴۵۵۸/۸۹) جمع‌آوری گردید. کلیه نمونه‌ها پس از صید بلافاصله در الکل اتانول ۹۶ درصد تثبیت و برای انجام آزمایش و مطالعات ژنتیکی به آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر و پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل گردیدند.



شکل ۱: مناطق نمونه‌برداری میگوی سفید در سواحل استان خوزستان

استخراج DNA با بهینه کردن روش استات آمونیوم با استفاده از قطعات عضله پای شنا انجام شد (Fevolden & Pogson, 1997) و بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده توسط دستگاه بیوفتومتر (مدل اپندورف) و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد صورت پذیرفت.

برای انجام واکنش PCR از ۵ جفت پرایمر ریزماهواره استفاده گردید (جدول۱). واکنش PCR با استفاده از ۵ µl بافر PCR (۱۰X)، dNTP با غلظت ۲۰۰µM، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، MgCl2 با غلظت ۲/۵ mM، ۲۰ نانوگرم DNA هدف و آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول واکنش به ۲۵µl برسد، انجام شد.

جدول ۱: توالی و مشخصات پرایمرهای ریزماهواره مورد استفاده برای میگوی سفید (Xu *et al.*, 2001)

جایگاه	توالی پرایمر 5'→3'	دمای اتصال (سانتیگراد)	محدوده آللی
TUZXPm4/82	F:ATTCATCAGCTAGCCTTG R:CGTTTACTGCATTCACTACC	٤٢	١٢٠-١٤٥
TUZXPm2/41	F:AAGGCAGATTTTCTAGCC R:ATCAAGGGAGACATTCAG	٤٢	٢٥٢-٢٨٤
TUZXPm4/9	F:ATCTGACAGGGCACCATAC R:AGTCGAGTCTTGAATAAGCG	٤٩	٢٥٧ -٢٨٤
TUZXPm4/45	F:ATCTCTACCAACCTGTCAGC R:TTAGTGAACCCCCTTCGTG	٤٢	٤١٢ -٤٣٤
TUZXPm4/85	F:CTTCGGCGGAAATATGTG R:TTGTGTTTGTGCGAGTGC	٤٩	٢٦٨ -٢٩٠

برنامه دستگاه ترمال سایکلر (مدل Auto-Q شرکت Quanta biotech) بترتیب شامل: مرحله اول واسرشته شدن (Denaturation) ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه برای یک چرخه و مرحله دوم اتصال پرایمرها به هدف (Annealing) ۴۹-۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله سوم بسط پرایمر (Extension) ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه برای ۳۰ چرخه تنظیم گردید.

مقدار (µl ۸-۷) محصول PCR با استفاده از ژل پلی‌اکریل آمید ۸ درصد الکتروفورز شد و سپس با نیترات نقره همراه با نشانگر ۵۰ bp DNA، رنگ‌آمیزی گردید. فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، تعداد آلل‌های واقعی و آلل‌های موثر برای هر جایگاه، ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی (Nei,1978)، تعادل هاردی- واینبرگ، مقادیر R_{st} و F_{st} ، جریان ژنی و تنوع ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار Gene Alex ver. 6 (Peakall & Smouse, 2005) و POPGENE ver. 1/3 (Yeh *et al*., 1999) محاسبه گردید. همچنین درخت موضع‌شناسی تکاملی براساس فاصله ژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) با استفاده از نرم‌افزار MEGA ver.4 ترسیم گردید (Tamura *et al*., 2007).

نتایج

در این بررسی ۶۰ نمونه عضله پای شنای میگوی سفید برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. غلظت DNA کلیه نمونه‌ها ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم بود که با توجه به نتایج الکتروفورز ژل آگارز از کیفیت مناسبی برخوردار بودند. نتایج حاصل از الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید در هر ۵ جایگاه در نمونه‌های مورد بررسی حالت پلی مورف نشان دادند.

حداکثر تعداد آلل‌ها در دو منطقه نمونه‌برداری در جایگاه TUZXPm2/41 با ۱۲ آلل و حداقل آن در جایگاههای UZXPm4/45وTUZXPm4/82 با ۵ آلل دیده شد (جدول ۲).

حداکثر فراوانی آللی در منطقه بحرکان و لیفه-بوسیف بترتیب ۰/۹۰ و ۰/۴۲ و حداقل آن ۰/۰۱۷ در هر دو منطقه بوده که مربوط به جایگاه TUZXPm2/41 می‌باشد.

جدول ۲: فراوانی آلل‌ها در جایگاههای مورد بررسی در مناطق مختلف نمونه‌برداری

جایگاه	TUZXPm 4/85		TUZXPm 4/45		TUZXPm 4/9		TUZXPm 2/41		TUZXPm 4/82	
آلل	لیفه بوسیف	بحرکان	لیفه بوسیف	بحرکان	لیفه بوسیف	بحرکان	لیفه بوسیف	بحرکان	لیفه بوسیف	بحرکان
۱	۰/۰۰	۰/۰۱۷	۰/۰۳۳	۰/۰۱۷	۰/۰۰	۰/۳۳	۰/۰۰	۰/۰۱۷	۰/۰۱۷	۰/۰۰
۲	۰/۰۳۳	۰/۰۰	۰/۱۱۷	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱۷	۰/۰۰	۰/۰۳۳	۰/۰۵	۰/۰۰
۳	۰/۰۰	۰/۰۳۳	۰/۵۱۷	۰/۱	۰/۰۳۳	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۳۳	۰/۰۸۳	۰/۱۵۰
٤	۰/۱۱۷	۰/۰۱۷	۰/۰۱۷	۰/۱	۰/۰۵۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۱۱۷	۰/۳۵	۰/۳۳۰
۵	۰/۲۵۰	۰/۰۸۳	۰/۲۳۳	۰/۳۵	۰/۰۳۳	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۱۵۰	۰/۰۱۷	۰/۵۰
٦	۰/۳۵۰	۰/٦۸۳	۰/۰٦۷	۰/۱٦۷	۰/۰۸۳	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۳۳	۰/۰۸۳	۰/۵۳
۷	۰/۰٦۷	۰/۱۵۰	۰/۰۱۷	۰/۱۵۰	۰/۱۵۰	۰/۰۰	۰/۲۱۷	۰/۰۵۰	۰/۳۵	۰/۲۳
۸	۰/۰۸۳	۰/۰۱۷	۰/۰۰	۰/۱۱۷	۰/٤۱۷	۰/۰۰	۰/۱٦۷	۰/۱۳۳	۰/۰۵	۰/۰۰
۹	۰/۰۵۰	۰/۰۰			۰/۲۳۳	۰/۹۰۰	۰/۳۰۰	۰/۳۰۰		
۱۰	۰/۰۵۰	۰/۰۰			۰/۰۰	۰/۰۱۷	۰/۱٦۷	۰/۱۳۳		
۱۱					۰/۰۰	۰/۰۳۳	۰/۱۱۷	۰/۰۰		
۱۲							۰/۰۳۳	۰/۰۰		

جدول ۳: مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He)، آلل های واقعی(Na) و موثر(Ne) در پنج جایگاه ریزماهواره پلی مورفیک در مناطق مختلف نمونه‌برداری میگوی سفید

منطقه	بحرکان				لیفه - بوسیف			
جایگاه	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He
TUZXPm 4/82	۵	۲/۷۴۰	۰/۳۰۰	۰/۶۳۵	۸	۲/۷۸۲	۰/۷۶۷	۰/۷۳۶
TUZXPm 2/41	۱۰	۵/۹۶۰	۰/۳۶۷	۰/۸۲۳	٦	٤/۸۲٦	۰/۲۰۰0	۰/۷۹۳
TUZXPm 4/9	۵	۱/۲۳۰	۰/۱۰۰	۰/۱۸۷	۷	۳/۸۱٤	۰/۳۳	۰/۷۳۸
TUZXPm 4/45	۷	٤/۱۳۹	۰/۱۰۰	۰/۷۹۳	۷	۲/۹۳۲	۰/۳۰۰	۰/٦۵۹
TUZXPm 4/85	۷	۲/۰۰۷	۰/۲۳۳	۰/۵۰۲	۸	٤/٦۲۷	۰/۲۰۰	۰/۷۸٤

بیشترین تعداد آلل‌های مشاهده شده و آلل‌های موثر در منطقه بحرکان بترتیب ۱۰ و ۵/۹۶ و کمترین آن ۵ و ۱/۲۳ بود. همچنین بیشترین تعداد آلل‌های مشاهده شده و موثر در منطقه لیفه بوسیف ۸ و ۴/۸۳ و کمترین آن ۶ و ۲/۹۳ بوده است (جدول ۳).

دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین مناطق نمونه‌برداری در جایگاههای پنجگانه بین ۰/۱ تا ۰/۷۷ بود. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه TUZXPm4/82 و در نمونه‌های منطقه لیفه بوسیف و کمترین مقدار در جایگاههای TUZXPm4/9 و TUZXPm4/45 در نمونه‌های منطقه بحرکان می‌باشد.

دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار در مناطق نمونه‌برداری بین ۰/۱۹ تا ۰/۸۲ بود. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده مربوط به جایگاه TUZXPm2/41 و کمترین مقدار آن مربوط به جایگاه TUZXPm4/9 در نمونه‌های منطقه بحرکان می‌باشد.

محاسبه ضرایب افت هتروزیگوسیتی نشان می‌دهد که در تمام مناطق نمونه‌برداری و در تمام جایگاهها (بغیر از TUZXPm4/82) افزایش هتروزیگوسیتی یا بعبارت دیگر بیشتر بودن مقادیر He نسبت به Ho وجود دارد.

براساس نتایج آزمون کای (χ^2) در هر دو منطقه بحرکان و لیفه بوسیف و جایگاههای مختلف ریزماهواره انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ مشاهده شده است ($P\leq 0.05$).

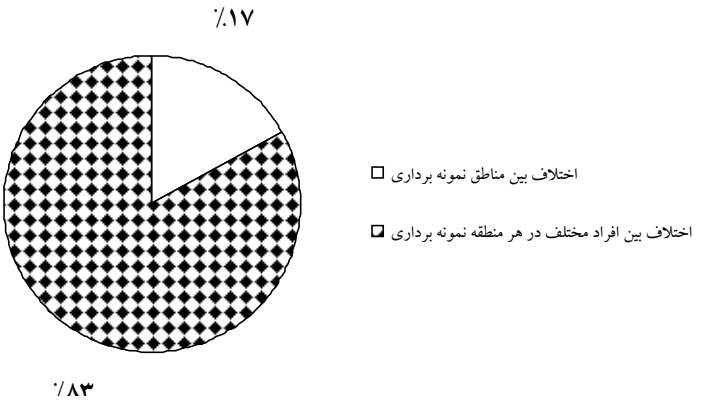
در بررسی حاضر میزان F_{st}، R_{st} و جریان ژنی (Nm) بین دو منطقه بحرکان و لیفه - بوسیف بترتیب ۰/۱۰۷، ۰/۳۷۲ و ۲/۲۹۰ محاسبه گردید.

براساس محاسبات انجام شده، بیشترین فاصله ژنتیکی میان نمونه‌های منطقه بحرکان و لیفه بوسیف ۰/۵۶۱ و کمترین شباهت ژنتیکی۰/۵۷۱ می‌باشد. براساس آنالیز واریانس مولکولی انجام شده اختلاف ژنتیکی بین نمونه‌های جمع‌آوری شده معنی دار می‌باشد ($P\leq 0.01$). نمودار ۱میزان تنوع ژنتیکی در درون و بین مناطق نمونه برداری میگوی سفید را نشان می‌دهد.

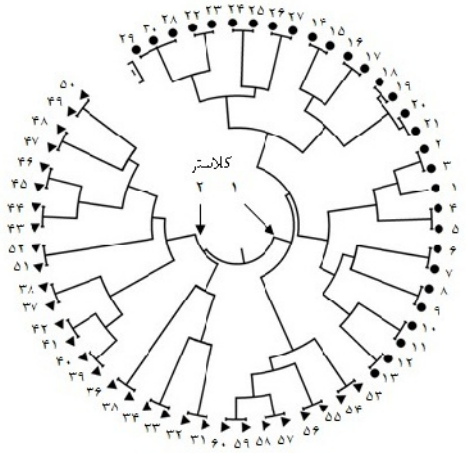
براساس فاصله ژنتیکی حاصل از تمام معیارهای بکار رفته نمونه‌های میگوی سفید مناطق بحرکان و لیفه بوسیف به دو کلاستر تقسیم شدند، که هر کلاستر نیز به زیرگروه‌های دیگری تقسیم‌بندی شد. افرادی که کمترین فاصله ژنتیکی از یکدیگر دارند در یک زیر گروه قرار گرفته‌اند. کلاستر اول به دو زیر گروه تقسیم شد که در بردارنده نمونه‌های بحرکان و لیفه بوسیف بود، کلونی اصلی این نمونه‌ها در بحرکان بود. کلاستر دوم شامل نمونه‌های منطقه لیفه - بوسیف بود.

جدول ٤: نتایج آزمون کای(χ^2) برای تعادل هاردی- واینبرگ برای جایگاههای ریزماهواره‌ای پلی مورفیک در مناطق بحرکان و لیفه - بوسیف

منطقه	عوامل تعادل χ^2	Pm 4/85	Pm 4/45	Pm 4/9	Pm 2/41	Pm 4/82
بحرکان	درجه آزادی	۲۱	۲۱	۱۰	٤٥	۱۰
	آزمون مربع کای	٥٨/٨٦	٦٨٦/١٢	٩/٤١	١٢٤/٨٩	٤٧/٤٧
	احتمال	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
	معنی‌دار بودن	***	***	***	***	***
لیفه بوسیف	درجه آزادی	۲۸	۲۱	۲۱	۱٥	۲۸
	آزمون مربع کای	١٢٨/٣٦	٦٦/٨٩	١١٧/٩٧	٨۰/٣٣	٥٧/٩٤
	احتمال	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
	معنی‌دار بودن	***	***	***	***	***



نمودار ۱: تنوع ژنتیکی بین نواحی و افراد هر منطقه در ۵ جایگاه ریزماهواره پلی مورفیک در میگوی سفید



نمودار ۲: درخت موضع شناسی تکاملی براساس فاصله ژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) میگوی سفید (•بحرکان، ▶ لیفه - بوسیف، ۱ الی ۳۰ بحرکان و ۳۰ الی ٦۰ لیفه - بوسیف)

بحث

حالت پلی‌مورفیسم در ژنوم هسته موجودات بعنوان شاخص ژنتیکی ارزشمند برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی برای محافظت از ذخایر ژنی گونه‌ها محسوب می‌شود (نویدی، ۱۳۸۵). اولین مرحله مهم در تدوین استراتژی مدیریت ذخایر آبزیان در منابع آبی، مشخص شدن ساختار ژنتیکی جمعیت‌های در حال بهره‌برداری است. این استراتژی در صورتیکه بر پایه روش‌های دقیق و قوی مثل داده‌های مولکولی باشد، می‌تواند علاوه بر حفظ تنوع زیستی، میزان برداشت و بهره‌برداری را به حد معقول و حداکثر برساند (Thai *et al*., 2006).

در بررسی حاضر تنوع ژنتیکی میگوی سفید در ۵ جایگاه ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفت. طبق مطالعاتی که توسط Robinson و همکاران (۲۰۰۲) پیرامون مطالعه ژنتیکی جمعیت‌های میگوی صورتی *Penaeus semisulcatus* در کوبا انجام گرفت، از میان ۷ جفت نشانگر ریزماهواره‌ای بررسی شده ۵ جفت آنها پلی مورفیک بودند. آنها تعداد آلل‌های مشاهده شده را بین ۴ تا ۳۳ آلل گزارش نمودند و این جایگاه‌ها را بعنوان ابزاری موثر در مطالعات ساختار ژنتیکی و رفتار جفت‌یابی در میگوها بیان داشتند.

Mathews و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از ۱۰ جایگاه ریزماهواره، تعداد ۶۰ نمونه از *Alpheu armillatus* را مورد مطالعه قرار دادند. در این بررسی تعداد آلل‌های مشاهده شده بین ۳ تا ۲۱ آلل بود. همچنین مطالعات Gao و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از ۱۲ جایگاه ریزماهواره‌ای جمعیت *Fenneropenaeus chinensis* را در تایلند مورد بررسی قرار دادند که ۵ تا ۱۵ آلل را در جایگاه‌های مختلف مشاهده نمودند. در بررسی حاضر تعداد آلل‌های مشاهده شده تقریباً مشابه مطالعات فوق بوده است.

آلل‌های مشاهده شده در هر جایگاه ژنی به شدت تحت تاثیر اندازه نمونه بوده و به همین جهت این امکان وجود دارد که در آزمایشات گوناگون با تعداد نمونه‌های متفاوت تعداد آلل‌های واقعی مختلفی برای یک جایگاه معین بدست آید (Peakal & Smous, 2005).

مطالعه تنوع زیستی در جوامع، مشخص کننده وسعت تنوع ژنی آن جامعه می‌باشد. راههای مختلفی برای این مطالعه وجود دارد که ساده‌ترین آن اندازه‌گیری فراوانی آلل‌ها یا ژنوتیپ‌ها می‌باشد. فراوانی هتروزیگوت‌ها از این جهت اهمیت داردکه هر هتروزیگوت ناقل آلل‌های متفاوتی است که این نشان‌دهنده وجود تنوع می‌باشد. به همین دلیل معمول‌ترین معیار تنوع ژنی در یک جمعیت میزان هتروزیگوسیتی می‌باشد (Brightte *et al*., 2005). هتروزیگوسیتی بیانگر طیف وسیعی از ژنوتیپ بعنوان پاسخ به سازش‌پذیری در شرایط متغیر محیطی است و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Beardmore *et al*., 1997).

در این بررسی هر دو منطقه نمونه‌برداری شده و در تمام جایگاه‌ها به غیر از جایگاه TUZXPm4/82 هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار پایین‌تر بود. کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار نشان‌دهنده کاهش در تغییرپذیری ژنتیکی نمونه‌هاست. علت این کاهش تنگناهای ژنتیکی می‌باشند که احتمالاً بر اثر صید بی‌رویه، استرس‌های زیست محیطی، تخریب زیستگاههای طبیعی، آمیزش‌های خویشاوندی بوجود می‌آید و در نتیجه با گذشت زمان موجب کاهش آلل و کاهش هتروزیگوسیتی در ذخائر می‌شود (Norris *et al*., 1999).

بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در نمونه‌های لیفه-بوسیف دیده شده که نشانه بالا بودن تنوع نسبت به جمعیت‌های ناحیه دیگر است. منطقه لیفه - بوسیف در دهانه رودخانه‌های اروند و بهمنشیر قرار دارد که در نتیجه ورود آب شیرین این دو رودخانه به خلیج فارس، باعث پایین آمدن شوری و غنای غذایی این منطقه می‌شود در حالیکه منطقه بحرکان از این قاعده مستثنی است. از سوی دیگر وجود خورهای متعدد در منطقه خور موسی (مجاور منطقه لیفه - بوسیف) سبب می‌گردد که میگوی سفید در این منطقه چرخه حیاتی خود را طی نموده و در خورها مراحل رشد اولیه و پرورشی خود را بگذرانند. خور بزرگی مانند خور موسی و خورهای منشعب از آن بعنوان منطقه نوزادگاهی برای میگوی سفید بحساب می‌آید و به نظر می‌رسد این خور وسیع سبب شده تا در منطقه لیفه بوسیف ذخیره میگوی بهتری نسبت به بحرکان بوجود آید (انصاری، ۱۳۸۳)، که با نتایج بررسی حاضر نیز همخوانی دارد. زیرا هر چه تکثیر طبیعی در منطقه بیشتر باشد تنوع ژنتیکی و هتروزیگوسیتی نیز بیشتر خواهد بود.

Xu و همکاران (۲۰۰۱) با بررسی تنوع ژنتیکی *P. monodon* در ۶ جایگاه ریزماهواره‌ای توانستند دو جمعیت را در سواحل فیلیپین از یکدیگر تفکیک نمایند. دامنه شاخص تنوع ژنتیکی در این ۶ جایگاه ۰/۴۶ تا ۰/۷۸ بود. این بررسی نشان داد که تنوع ژنتیکی درجمعیت‌های پرورشی در مقایسه با جمعیت‌های وحشی کمتر می‌باشد. دلایل زیادی از جمله رانش ژنتیکی، اثر تنگناهای ژنتیکی، انتخاب طبیعی و مصنوعی و انتقال ذخایر برای کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های پرورشی ذکر شده است.

مدل هاردی- واینبرگ ثبات فراوانی آلل‌ها را در نسل‌های مختلف پیش‌بینی می‌کند. در نتیجه این مدل برای بیان رابطه بین فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها و دستیابی به نتیجه معقول در رابطه با فرآیندهای موثر بر جوامع، مناسب می‌باشد (اریک، ۱۳۸۴). نتایج مطالعه حاضر نیز انحراف از تعادل هاردی-

واینبرگ در مناطق مورد بررسی را نشان داده که احتمالا به علت افزایش هموزیگوسیتی ناشی از وجود آلل‌های نول است. همچنین عدم صدق فرضیات مربوط به مدل هاردی- واینبرگ ممکن است ناشی از مکانیزم‌های بوم‌شناختی باشد.

طبق مطالعاتی که Xu و همکاران (۲۰۰۱) روی میگوی *P. monodon* در فیلیپین انجام دادند در ۳ جایگاه TUZXPm4/9، TUZXPm4/41 و TUZXPm4/85 وجود آلل‌های نول سبب افزایش هموزیگوسیتی نسبت به هتروزیگوسیتی شده که این امر موجب انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ شده است. همچنین در مطالعه Supungul و همکاران (۲۰۰۰) از ۵ نشانگر ریزماهواره‌ای که در ۵ منطقه جغرافیایی در تایلند انجام گردید، انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ در ۵ جایگاه و در تمامی مناطق گزارش شد، که علت آن افزایش هموزیگوسیتی بیان گردیده است.

همچنین Espinosa و همکاران (۲۰۰۱) ساختار جمعیتی *Litopenaeus Schmitti* را با استفاده از ۲ جایگاه ریزماهواره‌ای در کوبا مطالعه نمودند. نتیجه این بررسی حاکی از آن بود که با وجود اختلاف بین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، هیچگونه انحراف معنی‌داری از تعادل هادی- واینبرگ مشاهده نگردید.

فاکتور F_{st} بیان کننده توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی می‌باشد و بیانگر آن است که هرچه میزان جریان ژنی بین مناطق بیشتر باشد اختلاف ژنتیکی کمتر است (اریک، ۱۳۸۴). در این بررسی مقدار F_{st} بین دو جمعیت بحرکان و لیفه بوسیف ۰/۱۰۷ بود. مقدار F_{st} بین صفر تا ۰/۰۵ نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی پایین، بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و مقدار بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تمایز بالاست و مقدار بیش از ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی خیلی بالا را نشان می‌دهد (Hartl & Clark, 1989; Avise, 2004). در این مطالعه میزان تمایز بین جمعیت‌های بررسی شده (۰/۱۰۷) در محدوده تمایز ژنتیکی متوسط قرار دارد. Xu و همکاران (۲۰۰۱) در مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت *Penaeus monodon*، اختلاف معنی‌داری بین میگوهای وحشی در مناطق مختلف مانگرو مشاهده ننمودند. آنها علت این امر را وجود جریان ژنی زیاد در طول مراحل لاروی گونه مورد بررسی ذکر کردند. همچنین در این بررسی اختلاف ژنتیکی معنی‌داری بین میگوهای وحشی و پرورشی مشاهده گردید.

همانگونه که درخت موضع‌شناسی تکاملی نمونه‌های میگوی سفید در مناطق بحرکان و لیفه بوسیف نشان داد نمونه‌های مورد بررسی به دو کلاستر تقسیم شدند، که هر کلاستر نیز به زیرگروههای دیگری تقسیم‌بندی شد. البته در این تقسیم‌بندی نمونه‌ها کاملاً از هم جدا نبوده بلکه در بعضی قسمت‌ها با هم مشترک هستند و علت آن جریان ژنی می‌باشد که بین نمونه‌های دو منطقه وجود دارد. (N_m= ۲/۰۹۲) در مطالعه حاضر افرادی که کمترین فاصله ژنتیکی از یکدیگر را دارند در یک زیر گروه قرار گرفته‌اند.

معمولاً در توالی نوکلئوتیدی مربوط به یک ژن یا بخشی از یک ژن در گونه‌های مختلف یا حتی در افراد مختلف یک گونه تفاوت‌هایی به چشم می‌خورد که هر چند این تفاوت‌ها بسیار اندک می‌باشند ولی می‌توانند بعنوان معیاری جهت بررسی فاصله ژنتیکی در زمان اشتقاق دو گونه و همچنین بازسازی و مدل‌سازی تاریخچه تکاملی و رابطه خویشاوندی و در نهایت ترسیم درخت فیلوژنی احتمالی آنان مورد استفاده قرار گیرد (Gao *et al*., 2008). بطور معمول جریان ژنی بالا میان جمعیت‌ها موجب محدود کردن مهلت برای ایجاد تفاوت‌های ژنتیکی شده و از ظهور گونه‌های جدید ممانعت بعمل می‌آید. از آنجایی که پدید آمدن گونه‌های جدید منوط به افزایش اختلافات ژنتیکی میان جمعیت‌های جدا یا نسبتاً جدا از یکدیگر می‌باشد، بنابراین بطور قطع می‌توان میان پارامترهایی مانند جریان ژنی، فواصل جغرافیایی و گونه‌زایی ارتباط برقرار نمود (Beacham & Macconachi, 2004).

Supungul و همکاران (۲۰۰۰) در بررسی ساختار جمعیتی (*penaeus monodon*) در مناطق مختلف جغرافیایی در تایلند با استفاده از روش RAPD و RFLP، ۲ کلاستر جداگانه را در بین جمعیت‌های مختلف بدست آوردند که این نتایج با اطلاعات حاصل از روش ریزماهواره نیز مشابهت داشت.

با توجه به نتایج حاصله و ارزیابی مقادیر بدست آمده از فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی، تعادل هاردی- واینبرگ، F_{st}، R_{st} و ترسیم درخت موضع‌شناسی تکاملی میگوی سفید در مناطق مختلف نمونه‌برداری می‌توان نتیجه‌گیری نمود که میگوی سفید در سواحل خلیج فارس (استان خوزستان) از جمعیت واحدی برخوردار نبوده و حداقل دارای ۲ گروه ژنتیکی متفاوت در منطقه بحرکان و لیفه - بوسیف می‌باشد.

منابع

اریک، ه.، ۱۳۸۴. اصول و روش‌های مطالعات ژنتیکی ماهیان (جلد اول) ترجمه: ایرج هاشم‌زاده سقر لو، انتشارات نقش مهر. تهران. ۴۴۸ صفحه.

انصاری، ه.، ۱۳۸۳. پایش ذخیره میگو در آبهای ساحلی خلیج فارس (استان خوزستان). اداره کل شیلات خوزستان. گزارش نهایی. ۴۵ صفحه.

نیامیمندی، س.، ۱۳۷۲. مدیریت و ذخایر و صید میگو در خلیج فارس و دریای عمان. اداره کل شیلات استان. گزارش نهایی. ۲۶صفحه.

Avise J., 2004. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York, USA. 511P.

Beacham T.D. and Macconachi C., 2004. Microsatellite identification of individual sockeye salmon in Barkley Sound, British Colombia. Journal of Fish Biology, 61:1021-1032.

Beardmore J.A., Mair G.C. and Lewis R.I., 1997. Biodiversity in aquatic system in relation to aquaculture. Aquaculture Research, 28:829-839.

Brightte, J.; Hansen, M. and Loeschcker, V., 2005. Microsatellite DNA analysis of northern pick *Esox locius*) population: Insights into the genetic structure and demographic history of a genetically depauperatee specious. Journal of Linnaen Society, 814:1-11.

Baldwin. J.D. and Bass A.L., 1998. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. Molecular phylogenetics and Evolution, 10(3):399-407.

Espinosa G., Jager M., Garcia-Machado E., Pichs Y., Rodriguez N.C., Barcia A.R. and Deutsch J., 2001. Microsatellites from the white shrimp, *Litopenaeus schmitti* (Crustacea: Decapoda). Biotecnología Aplicada, 18:232- 234.

FAO, 1985. Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service. 10/06/1985.

Fevolden S.E. and Pogson G.H., 1997. Genetic divergence at the synaptophysin locus among Norwegian Coastal and North-east Arctic population of Atlantic Cod. Journal of Fish Biology, 51:895-908.

Gao H., Kong J., Yan B., Yu F., Luand S. and Shengli C., 2008. Twelve new microsatellite markers for the Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Molecular Ecology Resources, 8(2):325P.

Garcia S., 1984. A note on environmental aspects Penaeids shrimp biology and dynamics- FAO, Italy 271P.

Matheus L.M., 2006. Variable microsatellite markers for a snapping shrimp (*Alpheu armillatus*) species complex. Molecular Ecology Notes, 7(3):471-473.

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

Norris A.T., Breadley D.G. and Cuningham E. D., 1999. Microsatellite genetic variation between and with in farmed and wild Atlantic salmon population. Department of Genetics, Trinity College Dublin, Ireland. pp.247-264.

Peakall M. and Smouse A., 2005. Gene Alex 6: Genetic analysis in Excel .Population genetic software for teaching and research. The Australian national university, Canbera, Australia.

Robinson J.P. and Hariss S.A., 2002. Amplified fragment length Polymorphism and microsatellite: A Phylogenetic perspective. Journal of Fish Biology, 56:431-447.

Supungul P., Sootanan P., Klinbunga S., Kamonratm W., Jarayabhand P. and Tassanakajon A., 2000. Microsatellite polymorphism and the population structure of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand. Marine Biotechnology, 2:339-347.

Tamura K., Dudly J., Nei M. and Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24:596-1599.

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.

Xu Z., Primavera J.H., Pena L.D., Pettit P., Belak J. and Warren A.A., 2001. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using Microsatellites. Aquaculture, 199:13-40.

Yeh F.C., Yang R.C. and Boyle, T., 1999. Popgene . Version 1.31.

Genetic variation of *Metapenaeus affinis* in Persian Gulf coastal waters using microsatellite markers

Shokoohmand M.[(1)*]; Zolgharneen H.[(2)]; Laloei F.[(3)]; Fooroghmand A.M.[(4)] and Savari A.[(5)]

shokoomand _sa@yahoo.com

1,2,5- Marine Sciences and Technology of Khoramshahr University, P.O.Box: 669 Khoramshar, Iran

3- Caspian Sea Ecology Research Center, P.O.Box: 961 Sari, Iran

4- Genetic Group of Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran

Received: September 2010 Accepted: September 2011

Keywords: Population genetic, Diversity, *Metapenaeus affinis*, Persian Gulf

Abstract

Genetic diversity of *Metapenaeus affinis* population from the northern coasts of the Persian Gulf (Bahrakan, Lifeh-Boosiaf) was studies using microsatellite markers. During September to October 2007, 60 samples of pleopods tissue of the shrimp were taken and genomic DNA was extracted by acetate method. PCR was performed on microsatellite primers. To measure fragment size, samples were run on an 8% polyacrylamid gel. For each microsatellite locus, using genetic software, Pop Gene and Gene Alex, allele frequency, real and expected heterozygosity, F_{st} and R_{st} and other relevant factors were measured. Of the obtained 5 paired microsatellite primers, all were polymorphic. The mean observed and effective alleles number was 7 and 3.67, respectively and also the mean observed and expected heterozygosis was 0.27 and 0.66, respectively. It was also seen that specimens from all regions were not in Hardy-Weinberg Equibrium in all of the loci. Based on the analysis of molecular variance (AMOVA) $F_{st,}$ R_{st} and N_m were 0.107, 0.372 and 2.092, respectively. The highest genetic distance was 0.571 and the lowest was 0.561. The present study showed that two different populations of *Metapenaeus affinis* are living in the Bahrakan and Lifeh-Boosiaf region northwest coasts of the Persian Gulf.

*Corresponding author