بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) از دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) بروش RFLP

سهراب رضوانی گیل کلایی[۱] - سیدعلی سیدعلی‌بابایی[۲] - محمد پورکاظمی[۳]

۱- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵
۲- مرکز تحقیقات شیلاتی دریای عمان، بندرعباس صندوق پستی: ۱۵۹۷
۳- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، رشت صندوق پستی: ۳۴۶۴-۴۱۶۳۵
تاریخ دریافت : خرداد ۱۳۸۰ تاریخ پذیرش : مرداد ۱۳۸۰

چکیده

این تحقیق به منظور شناسایی جمعیتهای میگوی *Penaeus semisulcatus* دریای عمان و خلیج فارس صورت گرفت. نمونه‌برداری به روش تراولینگ از دو منطقه هرمز و بوشهر واقع در دریای عمان و خلیج فارس انجام شد که در نهایت ۴۰ نمونه از گونه *P. semisulcatus* از منطقه هرمز و ۳۵ نمونه از منطقه بوشهر جمع آوری شد.

استخراج DNA با استفاده از روش فنول-کلروفرم انجام گرفت. برای مطالعه تنوع جمعیتی میگوی ببری سبز از تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از RFLP ژن سیتوکروم اکسیداز I واقع بر روی ژنوم میتوکندری (mtDNA) که با تکنیک PCR تکثیر شده بود استفاده شد. برای هضم آنزیمی محصول PCR از ۹ آنزیم با اثرات محدود استفاده شد که ۵ آنزیم شامل HinfI, HincII, HpaII, RsaI و AluI الگوهای پلی مورفیسم نشان دادند. از ۵ نوع هاپلوتیپ بدست آمده (BBBBD, BBBBC, BBBBB, AAAAA, BBCBC) فقط در یک مورد (AAAAA) تشابه بین دو منطقه مورد بررسی (دریای عمان و خلیج فارس) مشاهده گردید. براساس نتایج حاصله از این بررسیها مشاهده شد که پراکنش هاپلوتیپها در دو منطقه تفاوت معنی‌دار و بالایی داشته و نشان دهنده تفاوت ژنتیکی ذخائر این جمعیتها با هم می‌باشد. به عبارت دیگر ذخائر ذکر شده، جمعیت کاملاً جدا از هم می‌باشند.

لغات کلیدی: میگو ببری سبز، *Penaeus semisulcatus* ژن سیتوکروم اکسیداز I

مقدمه

خلیج فارس و دریای عمان دارای تنوع زیستی بالایی می‌باشند. بطوریکه تاکنون بیش از ۴۶۵ گونه ماهی در منطقه خلیج فارس و دریای عمان شناسایی شده است (دهقانی و اسدی، ۱۳۷۵). علاوه بر گونه های ماهی، ۲۰ گونه میگو در خلیج فارس و دریای عمان شناسایی گردیده که اکثراً متعلق به خانواده Penaeidae می‌باشند. گونه *Penaeus semisulcatus* گونه غالب منطقه خلیج فارس و گونه‌های *P. merguiensis* و *P. affinis* گونه غالب دریای عمان بحساب می‌آیند. میگوها گسترش جهانی داشته و در دریاها، آبهای شور و شیرین از نواحی استوایی تا مناطق قطبی یافت می‌شوند. بیشتر گونه‌های تجارتی در فلات قاره و اعماق کمتر از ۱۰۰ متر زیست می‌کنند. بیشتر میگوها پلاژیک و برخی نیز کفزی بوده و در مناطق متنوعی از لحاظ اکولوژیک بسر می‌برند. پراکنش میگوی ببری سبز در خلیج فارس و دریای عمان در شکل شماره (۱) آورد شده است.

شکل شماره ۱ : ۱و۲ مناطق نمونه برداری میگو ی ببری سبز(*P.semisulcatus*) در آبهای بندرعباس و بوشهر

شکل ۱: ۱ و ۲ مناطق نمونه‌برداری میگوی ببری سبز *P. semisulcatus* در آبهای بندرعباس و بوشهر

میگوی ببری سبز بعد از میگوی سفید هندی (*P. indicus*) گونه‌ای است که در توسعه کشت و پرورش میگو در مزارع پرورشی سواحل جنوبی کشور مورد توجه قرار گرفته است و از اقلام مهم صادراتی آبزیان کشور می‌باشد.

یکی از مشکلاتی که صیادان میگو در استانهای بوشهر و هرمزگان داشته و دارند نوسانات صید سالانه است که بنظر میرسد یکی از دلایل آن ناشی از بروز رفتارهای متفاوت مهاجرتی میگوی ببری سبز باشد. اعمال مدیریت یکسان در بهره‌برداری از نظر اعلام شروع و خاتمه صید بطور همزمان از سوی شیلات در آبهای دو استان، بدلیل وجود جمعیت‌های متفاوت که رفتارهای تولید مثلی، تغذیه‌ای و مهاجرتی متفاوت از هم دارند، ممکن است روش صحیحی نباشد.

آگاهی از اینکه میگوی‌های ببری سبز در دو اکوسیستم خلیج فارس و دریای عمان دارای ساختار ژنتیکی واحد بوده و متعلق به یک جمعیت می‌باشند یا دارای جمعیتهای متفاوتی هستند در برنامه‌ریزی مدیریت شیلاتی برای بهره‌برداری از ذخایر دریایی و توسعه پرورش میگو با استفاده از مولدین دریایی و نیز در امر بازسازی ذخایر از طریق تکثیر مصنوعی میگو و رهاسازی پست لاروها به دریا حائز اهمیت می‌باشد.

اگرچه در دهه گذشته در مقایسه با سایر مهره‌داران، مطالعات مولکولی روی گونه‌ها و جمعیت‌های آبزیان محدود بوده است (Meyer, 1993)، اما در سالهای اخیر با مطالعه مولکولی روی ماهی Blue gill (*Lepomis macrochirus*) (Avise *et al.*, 1984) کم‌کم به کارگیری روشهای مولکولی در بررسیهای فیلوژنیک و جمعیتی آبزیان بعنوان یک روش دقیق و مطمئن افزایش یافته است. تعیین توالی نوکلئوتیدهای mtDNA در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) توسط Chang و همکارانش در سال ۱۹۹۴ و در مورد ماهی کاد اقیانوس اطلس توسط Johansen و همکارانش در سال ۱۹۹۴ منتشر شد و نیز روشهای مولکولی در بررسی جمعیت گونه‌هایی از آزاد ماهیان (Bermingham *et al.*, 1991 ؛ Park *et al.*, 1993)، از اسکالوپ (Wilding *et al.*, 1997)، ماهیان خاویاری (Rezvani Gilkolaei, 1997,1999, 2000 ؛ Pourkazemi, 1996)، لابستر (Ovenden *et al.*, 1992) و میگو (Anitha *et al.*, 1997) صورت پذیرفته که نشانگر اختلاف ژنتیکی زیاد در بین گونه‌ها و یا افراد داخل گونه بوده است.

مواد و روشها

نمونه‌ها از فاصله ۱۰ تا ۱۲ مایلی ساحلی در آبهای بوشهر به روش ترال کف، به تعداد ۳۵ میگو و نیز از منطقه هرمز در آبهای بندرعباس به تعداد ۴۰ میگو از گونه *P. semisulcatus* جمع‌آوری گردیدند. سپس تکه‌هایی از بافتهای مختلف (آنتن‌ها، عضله، پرئوپودهاو پلئوپودها) در الکل خالص نگهداری گردید و نمونه‌ها برای انجام آزمایشات به رشت، انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری منتقل شدند.

DNA کامل که شامل DNA هسته و DNA سیتوپلاسمی (mtDNA) می‌باشد با استفاده از ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت بروش فنول وکلروفرم (Hillis & Moritz, 1990) استخراج گردید و ۳ تا ۴ میکرولیتر از DNA هر نمونه همراه با بافر LB (Loading buffer) در ژل آگارز یک درصد رانده شده و الکتروفورز گردید. بعد از مشاهده DNA باکیفیت مطلوب نمونه‌های DNA برای انجام آزمایشات بعدی در ۲۰ ـ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

برای ازدیاد قطعه ژن سیتوکروم اکسیداز I (DNA amplification) از یک جفت پرایمر استفاده شد که براساس اطلاعات بدست آمده از جستجو در اینترنت، از توالی ژن مذکور در گونه ببری سبز (*P. semisulcatus*) بوده که پرایمر Forward (۲۳ نوکلئوتید) با A و پرایمر Reverse (۲۲ نوکلئوتید) با B طراحی و نامگذاری گردید و از طریق مرکز تحقیقات مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی زیستی ساخته شد.

قطعه ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) تقریباً با همان روشی که توسط رضوانی گیل‌کلائی در سال ۱۹۹۷ شرح داده شده، بااستفاده از DNAهای استخراج شده از نمونه‌ها، ۲۰ تا ۴۰ پیکومول پرایمرهای ساخته شده، dNTP، بافر آنزیم، آنزیم Taq DNA Polymerase، $MgCl_2$ و آب مقطر که حجم محلول واکنش را به ۵۰ میکرولیتر می‌رساند، مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها پس از آماده سازی در دستگاه ترموسایکلر (Pharmacia/Thermal cycler TC341) با برنامه یک دور بمدت ۴ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای Denaturation و در ادامه ۳۰ دور که یک دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد Denaturation و یک دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد برای پهلوگیری پرایمر یا جلودار در کنار DNA تک رشته‌ای شده (anealing) و همینطور بمدت یک دقیقه و سی ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگرادبرای اجرای مرحله Extention و در نهایت با اضافه کردن یک سیکل اضافی بمدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگرادبرای Extention بیشتر قرار گرفتند.

محصول PCR با اندازه‌های ۵۳۰ تا ۵۵۰ جفت باز با استفاده از ۹ آنزیم قطع کننده محدود اثر، هضم گردیدند که آنزیم‌ها عبارت بودند از:

Alu I ,Hinf I ,Hinc II ,Hpa II ,Rsa I ,Dde I ,Hind III ,Pvu II ,Taq I

و محلول واکنش آنزیمی حاوی مقدار ۰/۱ محصول PCR همراه با ۲ ماکرولیتر بافرآنزیم (۱۰ درصد حجم نهایی محلول واکنش) و ۰/۵ تا ۱ ماکرولیتر از آنزیم‌های مختلف (۵U تا ۱۰U) بنابه توصیه شرکتهای سازنده و آب مقطر به اندازه‌ای که محلول را در تیوب ۱/۵ میلی‌متری به ۲۰ ماکرولیتر برساند، بود. نمونه‌ها برای تمام آنزیم‌ها بجز برای آنزیم Taq I (که در ۶۵ درجه سانتیگراد اثر می‌کند) در ۳۷ درجه سانتیگراد بیش از یک ساعت انکوباسیون گردیدند.

محصول هضم شده قطعه ژن ازدیاد شده در گودیهای ژل پلی اکریلامید ۶ درصد قرار گرفتند و نمونه‌ها برای مدت ۲/۵ تا ۳ ساعت با ولتاژ ۱۰۰ تا ۱۲۰ ولت رانده شدند و در نهایت با روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند.

باندهای DNA بوجود آمده پس از هضم آنزیمی با استفاده مارکر DNA (۵۰bp مارکر) اندازه‌گیری شدند و براساس اینکه هر نمونه دارای چه ژنوتیپی بوده با استفاده از حروف الفبای بزرگ A, B و... هاپلوتیپ هر نمونه بصورت توالی از این حروف معین گردیدند.

پس از تهیه جدول هاپلوتیپ نمونه‌ها، برای آنالیز آماری از نرم‌افزار Reap و برنامه مشابه سازی Monte-Carlo simulation X^2 استفاده شد.

نتایج

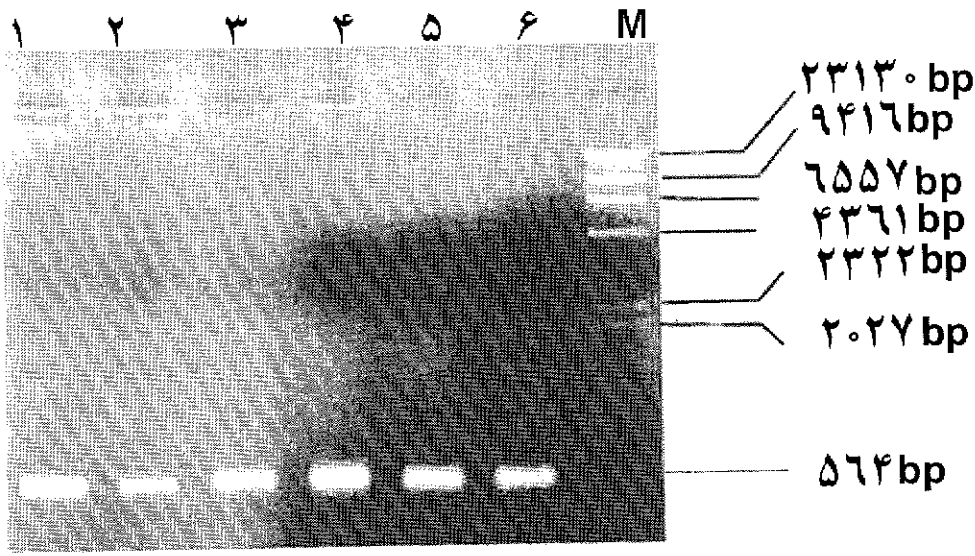
طول تقریبی قطعه تکثیر شده (PCR) ۵۳۰ تا ۵۵۰ جفت باز بود که این اندازه در تمام نمونه‌ها مشابه نبوده است، به صورتی که ۲۹ نمونه از منطقه بندرعباس تقریباً ۵۵۰ جفت باز و ۱۱ نمونه از همین منطقه تقریباً ۵۳۰ جفت باز را نشان دادند. در حالیکه تمام نمونه‌های بوشهر باندی را (محصول PCR) در اندازه ۵۳۰ جفت باز نشان دادند (شکل ۲) اگر چه این تفاوت در ژلهای الکتروفورز محصول PCR خیلی مشهود نمی‌باشد اما بعد از هضم آنزیمی مشهودتر است (شکلهای ۳ و ۴).

۵ آنزیم محدود اثر از ۹ آنزیم محدود اثر استفاده شده (Alu I ,Hinf I ,Hinc II ,Hpa II, Rsa I) الگوهای پلی مورفیسم یا چند شکلی را نشان دادند و سایر آنزیم‌ها دارای الگوهای

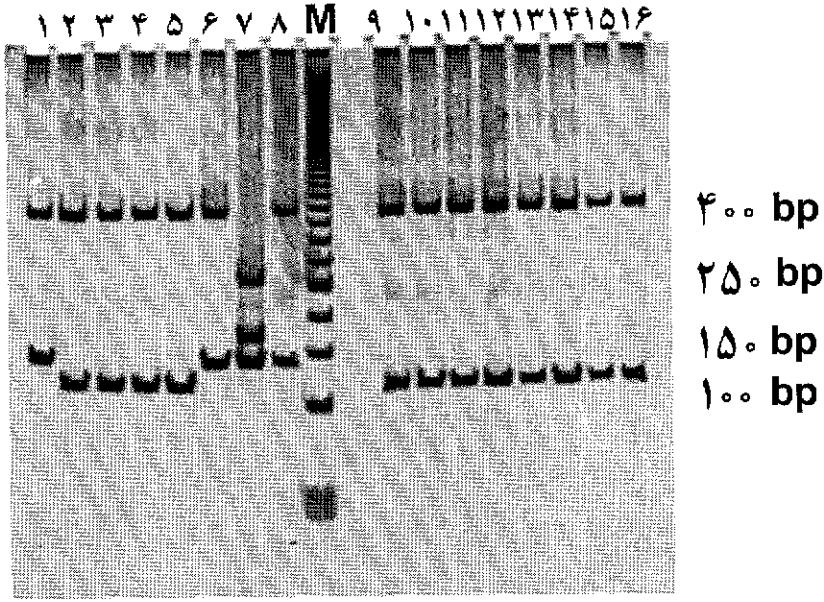
مشابه در بین نمونه‌ها بودند.

آنالیز RFLP حاضر ۵ هاپلوتیپ متفاوت (BBBBD, BBBBC, BBBBB, AAAAA, BBCBC) را در ۷۵ نمونه از میگوی ببری سبز *P. semisulcatus* متعلق به دو منطقه مورد مطالعه (دریای عمان و خلیج فارس) نشان داد. دو هاپلوتیپ از ۵ هاپلوتیپ نشان داده شده دارای فراوانی یک بوده که این نوع هاپلوتیپ‌ها را هاپلوتیپ نادر (rare haplotype) می‌نامند. هر دو مورد از این هاپلوتیپها متعلق به منطقه هرمز (دریای عمان) می‌باشند و فقط یک هاپلوتیپ مشترک (AAAAA) از بین ۵ هاپلوتیپ بدست آمده بین دو جمعیت مورد مطالعه، مشاهده شد (جدول ۱).

میانگین عددی تنوع نوکلئوتیدها (Diversity) و تنوع هاپلوتیپها در داخل جمعیتها ۰/۰۰۱۱۹۵۲ ± ۰/۰۳۴۵۷۲ و ۰/۰۸۱۷۴ ± ۰/۲۸۵۹ و اختلاف نوکلئوتیدها (Divergence) بین جمعیتهای مورد مطالعه ۸/۵ درصد تخمین زده شد.



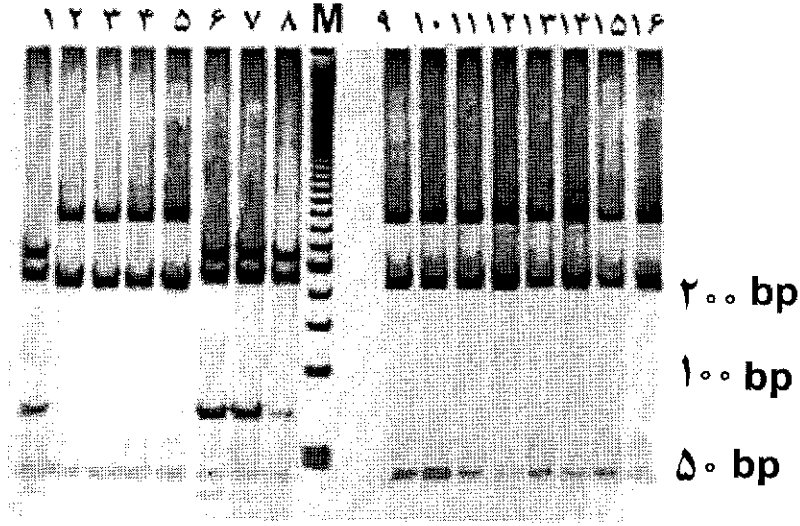
شکل ۲: محصول PCR نمونه‌های میگوی مناطق هرمز و بوشهر (ستونهای ۱، ۲ و ۳ مربوط به نمونه‌های هرمز و ستونهای ۴، ۵ و ۶ مربوط به نمونه‌های بوشهر و ستون M (مارکر) مربوط به ژنوم لامبدا هضم شده با آنزیم Hind III می‌باشد).



شکل ۳: الگوی هضم آنزیمی ژن سیتوکروم اکسیداز I با استفاده از آنزیم Hinf I . ستونهای ۱ تا ۸ مربوط به نمونه‌های میگوی گونه *P. semisulcatus* منطقه هرمز و ستونهای ۹ تا ۱۶ مربوط به منطقه بوشهر و ستون M مربوط به مارکر (۵۰bp) می‌باشد.

جدول ۱: فراوانی و درصد هاپلوتیپها در نمونه‌های مربوط به ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) هضم شده با آنزیمهای (Rsa I, Hpa II, Hinc II, Hinf I, Alu I) در بررسی جمعیت گونه *P. semisulcatus* موجود در منطقه هرمز و بوشهر

هاپلوتیپ	هرمز (دریای عمان)	درصد	هاپلوتیپ	بوشهر (خلیج فارس)	درصد
AAAAA	۱۱	۲۷/۵	AAAAA	۳۵	۱۰۰
BBBBB	۱	۲/۵	BBBBB	۰	۰
BBBBC	۲۴	۶۰	BBBBC	۰	۰
BBBBD	۳	۷/۵	BBBBD	۰	۰
BBCBC	۱	۲/۵	BBCBC	۰	۰
جمع	۴۰	۱۰۰	جمع	۳۵	۱۰۰



شکل ۴: الگوی هضم آنزیمی ژن سیتوکروم اکسیداز I با استفاده از آنزیم Alu I. ستونهای ۱ تا ۸ مربوط به نمونه‌های میگوی گونه *P. semisulcatus* منطقه هرمز و ستونهای ۹ تا ۱۶ مربوط به منطقه بوشهر و ستون M مربوط به مارکر (۵۰bp) می‌باشد.

بحث

مشابه سازی سری‌های هاپلوتیپ تمام نمونه‌های بین دو جمعیت با استفاده از برنامه X^2 Monte-Carlo simulation (Roff & Bentzen, 1989) انجام شد. تست X^2 اختلاف در پراکنش هاپلوتیپها بین دو منطقه مورد مطالعه را بالا و معنی‌دار (X^2 =۴۱/۳۷، P<0.00001) نشان داد. بدین ترتیب ملاحظه می‌شود که تکرار هاپلوتیپهای mtDNA در دو منطقه مورد مطالعه با همدیگر تفاوت معنی دار دارند.

تنوع هاپلوتیپها و نوکلئوتیدها (Diversity) و اختلاف آنها در بین دو منطقه مورد مطالعه بالا می‌باشد به صورتیکه میزان تنوع هاپلوتیپها در جمعیت منطقه هرمز ۰/۰۶۵۹۹ ± ۰/۵۷۱۸ و

در جمعیت منطقه بوشهر ۰۰۰۰/۰ و میانگین عددی آن ۰۸۱۷۴/۰±۲۸۵۹/۰ بود.

میزان تنوع نوکلئوتیدها (Nucleotide diversity) در جمعیت منطقه هرمز ۰۶۹۱۴۳/۰ بدست آمد.

همچنین اختلاف نوکلئوتید بین جمعیتهای میگوی ببری سبز منطقه هرمز و بوشهر در حدود ۸/۵ درصد برآورد شد که با فرض وجود ۲ درصد موتاسیون در هر یک میلیون سال در مولکول mtDNA (Wilson *et al.*, 1985) جمعیتهای میگوی ببری سبز خلیج فارس و دریای عمان با دارا بودن ۸/۵ درصد Divergence بنظر می‌رسد حدود چهار میلیون و دویست و پنجاه سال قبل از هم جداگردیده‌اند (صحت این ادعا نیاز به بررسی بیشتر دارد).

احتمالاً به دلیل اینکه پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق از روی توالی ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) که توسط Baldwin و همکارانش در سال ۱۹۹۸ گزارش شده بود طراحی شده‌اند و در طراحی پرایمرها از ۸ جفت باز انتهایی رشته مذکور صرف نظر شده است، محصول PCR مورد انتظار می‌بایست تقریباً ۵۵۰ جفت باز باشد. که در نمونه‌های جمع آوری شده از دریای عمان (بندرعباس) اندازه رشته ژن ازدیاد یافته در حد میزان قابل پیش بینی (۵۵۰ جفت باز) بوده در حالیکه در نمونه‌های جمع آوری شده از بوشهر تقریباً دارای ۲۰ جفت باز کمتر می‌باشد که میتواند ناشی از پدیده حذف (deletion) یااضافه شدن (addition) توالی تعدادی از نوکلئوتیدها در طول رشته ژن باشد که نیاز به تعیین توالی کامل رشته‌های ژن مورد نظر در نمونه‌های دو منطقه خلیج فارس و دریای عمان می‌باشد.

تجزیه و تحلیل RFLP حاصر روی ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) تکثیر شده با استفاده از تکنیک PCR تنوع بالای هاپلوتیپ‌ها و نوکلئوتیدها را در منطقه هرمز و تنوع پائین هاپلوتیپ‌ها و نوکلئوتیدها را در منطقه بوشهر نشان می‌دهد. به هر حال اختلاف نوکلئوتیدها مابین جمعیتهای مورد مطالعه بالا می‌باشد.

اگر چه تنوع ژنتیکی بین میگوهای متعلق به خانواده پنائیده به روش الکتروفورز آلوزایم میزان پائین تنوع را نشان داده است (Baldwin, *et al.*, 1998)، اما بررسیهای ایزوزیمهای پروتئینی، اختلافات ژنتیکی را در میان گونه‌های میگوی مشابه از لحاظ مورفولوژیک در حد بالایی نشان داده است (Palumbi & Benzie, 1998). تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتیدها قطعه ۵۵۸ جفت باز متعلق به ژن سیتوکروم اکسیداز I mtDNA اختلاف بالای ژنتیکی را مابین ۱۳ گونه از میگوهای جنس *Penaeus* نشان داده که این یافته‌ها با کارهای قبلی که اختلاف ژنتیکی براساس الکتروفورز آلوزیمها بررسی شده بود و اختلافات ژنتیکی را در جنس *Penaeus* خیلی پائین نشان داده بود، مغایرت دارد (Baldwin *et al.*, 1998).

نتایج بررسی جمعیتهای میگوی *P. indicus* دو منطقهٔ Cochin و Madras حاکی از اختلاف ژنوتیپهای mtDNA مابین جمعیتهای این گونه در دو منطقه مورد مطالعه می‌باشد. در این مطالعه که با استفاده از تکنیک RFLP روی ژنوم میتوکندری انجام شده، از ۱۳ آنزیم محدود اثر برای هضم آنزیمی ژنوم میتوکندری (۱۸۰۰۰bp) استفاده شد. در نهایت حالت یکنواختی ژنوتیپهای حاصله با استفاده از ۱۰ آنزیم از ۱۳ آنزیم محدود اثر مورد استفاده، گزارش گردید و حالت پلی مورفیسم فقط با استفاده از ۳ آنزیم باقیمانده از ۱۳ آنزیم مورد استفاده گزارش شد (Anitha *et al.*, 1997).

وجود اختلافات بالای mtDNA بین بیشتر گونه‌های خانوادهٔ پنائیده با شباهتهای مورفولوژیک بالا گزارش شده است. در سایر مطالعات انجام شده میزان اختلاف ژنتیکی زیر جنس *Litopenaeus* ۷/۴ درصد گزارش شده است. در صورتیکه بین زیر جنس *Penaeus* این اختلافات در حدود ۱۸ درصد می‌باشد (Palumbi & Benzie, 1998).

با وجود شباهتهای مورفولوژیک، فیزیولوژیک و اکولوژیک، *P. stylirostris* و *P. vannamei* این دو گونه دارای اختلاف در نقاط خاموش ژنوم میتوکندری بوده و این اختلاف

زیادتر از اختلاف بین انسان و شامپانزه یا گوسفند و بز می‌باشد. از این رو می‌توان نتیجه گرفت که تفاوتهای بالای ژنتیکی بین گونه‌های میگو با تفاوتهای مورفولوژیک مطابقت نداشته و اختلاف بالای mtDNA بین بیشتر گونه‌های میگوی پنائیده با تشابهات مورفولوژیک بالا، حیرت‌انگیز می‌باشند.

از اینرو Palumbi و Benzie در سال ۱۹۹۸ دو نظریه برای تفاوتها در مسیر تکامل مولکولی و مورفولوژیک میگو ارائه داده‌اند که عبارتند از:

۱ - میزان تکامل mtDNA ممکن است به سرعت افزایش یافته باشد.

۲ - میزان بروز تفاوتهای مورفولوژیک در میگوها ممکن است به کندی صورت پذیرد.

نتایج مطالعه حاضر نیز وجود اختلافات ژنتیکی بین نمونه‌های مربوط به گونه *P. semisulcatus* با تشابه مورفولوژیک در منطقه بندرعباس را نشان می‌دهد. همچنین وجود تفاوتهای ژنتیکی گونه *P. semisulcatus* در دو منطقه مورد مطالعه به اثبات رسید.

براساس نتایج حاصل از این بررسی می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که ذخایر میگوی *P. semisulcatus* در بوشهر (خلیج فارس) و منطقه هرمز (دریای عمان) دارای ساختار ژنتیکی متفاوتی می‌باشند. بطوریکه در بوشهر فقط یک هاپلوتیپ (AAAAA) با ۱۰۰ درصد فراوانی مشاهده گردید که هاپلوتیپ فوق در منطقه هرمز هم با ۲۷/۵ درصد فراوانی مشاهده گردید. در حالیکه ۴ هاپلوتیپ دیگر (BBBBB, BBBBC, BBBBD و BBCBC) فقط در منطقه هرمز مشاهده شدند و در منطقه بوشهر رویت نگردیدند. این امر بیانگر آن است که بخشی از میگوهای *P. semisulcatus* بین دو منطقه بوشهر و هرمز مهاجرت می‌کنند (هاپلوتیپ AAAAA) و به عبارت دیگر جریان ژنی بین دو جمعیت وجود دارد. ولی منطقه هرمز دارای میگوهایی است که ساختار ژنتیکی متفاوتی با منطقه بوشهر دارد و بویژه هاپلوتیپ BBBBC با درصد فراوانی بالا (۶۰ درصد) می‌تواند بعنوان یک شاخص و مارکر ژنتیکی برای شناسایی میگوهای

منطقه هرمز تلقی گردد.

با توجه به موارد اشاره شده همچنین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که هاپلوتیپهای BBBBB, BBCBC و BBBBD از مشتقات هاپلوتیپ BBBBC می‌باشند، که در اثر جهش تشکیل گردیده‌اند. مطالعات قبلی روی میگوی ببری سبز که از طریق بررسیهای مورفومتریک - مریستیک انجام گرفته بود، تفاوت میگوهای دو منطقه فوق را نشان می‌داد که تأیید نتایج حاصله از این بررسی است (متین فر، ۱۳۷۸).

از آنجائیکه حدود ۲۷/۵ درصد نمونه‌های میگوی ببری سبز از منطقه هرمز از لحاظ ژنوتیپ مشابه با منطقه بوشهر بودند و طرح ژنوتیپی به دست آمده مربوط به دو منطقه مورد مطالعه، در بقیه موارد با همدیگر تفاوت داشته‌اند، می‌توان نتیجه گرفت گروهی که از منطقه هرمز مشابه با گروه منطقه بوشهر می‌باشد به دلایلی مسیر حد فاصل این دو منطقه را طی کرده است. که مؤید جریان ژنتیکی جمعیتهای این دو منطقه می‌باشد. بدلیل نبود سد فیزیکی بین دو منطقه متفاوت این امر ممکن است اتفاق بیفتد و یا وجود جریانهای آبی قوی در جهت عقربه ساعت ممکن است موجب جابجایی لاروها و سازگاری آنها در محیط جدید شود.

نتیجه اینکه، گونه *P. semisulcatus* در آبهای خلیج فارس و دریای عمان دارای حداقل دو ساختار ژنتیکی متفاوت بوده و بطور معناداری این تفاوت نشان داده شده است.

روش PCR-RFLP در این بررسی دارای کارایی بالایی بوده و علاوه بر قابلیت تمایز دو جمعیت جداگانه از میگوی ببری سبز، قادر بوده چند هاپلوتیپ را برای این دو منطقه مورد بحث، بطور اختصاصی معرفی نماید. پیشنهاد می‌شود این بررسی با جمع‌آوری نمونه‌های بیشتر از دیگر مناطق مانند خوزستان و چابهار نیز تکرار شود. و با این روش سایر گونه‌های پر اهمیت میگو مانند *P. indicus* و *P. merguiensis* نیز مورد بررسی و تحقیق قرار گیرند.

وجود تفاوت ژنتیکی معنی‌دار بین جمعیت‌های میگو ببری سبز خلیج فارس و دریای عمان

ضرورت اعمال مدیریت متفاوت در امر بهره‌برداری و صید و نیز توسعه پرورش اینگونه از میگو را می‌طلبد. برای این منظور رفتارهای تولید مثلی، تغذیه‌ای و مهاجرتی این دو جمعیت لازم است مورد مطالعه و تحقیق دقیق قرار گیرد.

منابع

دهقانی پشترودی، ر. و اسدی، ه. ، ۱۳۷۵. اطلس ماهیان خلیج فارس و دریای عمان. سازمان تحقیقات و آموزش شیلات ایران. ۲۲۶ صفحه.

متین‌فر، ع. ، ۱۳۷۸. بررسی و تعیین تنوع گونه‌ای و شناسایی جمعیتهای میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) در آبهای شمالی خلیج فارس. پایان‌نامه دکترا دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۵۳ صفحه.

Anitha, A. ; Selvam, G.S. and Sheeja, K. , 1997. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA(mt DNA) in two population of *Penaeus indicus*. H. Milne Edwards. Ind. J. Exp. Biol. Vol. 25, pp.946-951.

Avise, J.C. ; Bermingham, E. ; Kessler, G. and Saunders, N.C. , 1984. Characterisation of mitochondrial DNA variability in a hybrid swarm between subspecies of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). Evolution Vol.38, pp.931-941.

Baldwin, J.D. ; Bass, A.L. ; Bowen, B.W. and Clark Jr., W.H. , 1998. Molecular Phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. Mol. Phylogen. Evo. Vol. 10, No. 3, pp.399-407.

Bermingham, E. ; Forbes, S.H. ; Friedland, K. and Pla, C. , 1991. Discrimination

between Atlantic salmon (*Salmo salar*) of North American and European origin using restriction analysis of mtDNA. Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol. 48, No. 5, pp.884-893.

Chang, Y.S. ; Huang, F.L. and Lo, T.B. ,1994. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. J. Mol. Evol. Vol. 38, No. 2, pp.138-155.

Hillis, D.M. and Moritz, C. , 1990. Molecular Taxonomy. Sinauer associtates, Inc. Publishers. Massachusetts. U.S.A.

Johansen, S. ; Berg, T. and Moum, T. , 1994. Variability and evolution of mitochondrial DNA sequences from marine animals. *In*: Third International Marine Biotechnology Conference, Tromso, Norway, 133 P.

Meyer, A. , 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *In*: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, 2 molecular biology frontiers. Ed. Hochachka. pp.1-33.

Ovenden, J.R. ; Brasher, D.J. and White, R.W.G. , 1992. Mitochondrial DNA analyses of the red rock Lobster (*Jasus edwardsii*) supports an apparent absence of population subdivision throughout Australia. Mar. Biol., Vol. 112, No. 31, pp.119-326.

Palumbi, S.R. and Benzie, J. , 1998. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. Vol. 1, No. 1, pp.27-34.

Park, L.K. ; Brainard, M.A. ; Dightman, D.A. and Winans, G.A. , 1993. Lowlevel of intraspescific variation in the mitochondrial DNA of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Mol. Mar. Biol. Biotechnol. Vol. 2, No. 6, pp.362-370.

Pourkazemi, M. , 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the Caspian Sea. Ph.D. Thesis, School of Biological Sciences, University of Wales, Swansea. 260 P.

Rezvani Gilkolaei, S. , 1997. Molecular population genetic studies of sturgeon species in the southern Caspian Sea. Ph.D. Thesis, School of Biological Sciences University of Wales, Swansea. 196 P.

Rezvani Gilkolaei, S., 1999. Polymerase chain reaction (PCR) and direct sequence of mtDNA from the ND5/6 gene region in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) from the southern Caspian Sea. Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 1, No. 1, pp.24-34.

Rezvani Gilkolaei, S. , 2000. Study of mtDNA variation of Russian sturgeon population from southern Caspian Sea using RFLP analysis of PCR amplified ND5/6 gene regions. Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 2, No. 1, pp.13-36.

Roff, D.A. and Bentzen, P. , 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: X^2 problem of small sample size. Mol. Biol. Evol. Vol. 2, pp.539-545.

Wilding, C.S. ; Beaumont, A.R. and Latchford, J.W. , 1997. Mitochondrial DNA

variation in the scallop *Pecten maximus* (L), assessed by a PCR-RFLP method. Heredity, Vol. 79, pp.178-189.

Willson, A.C. ; Cann, S.M. ; George, M. ; Gyllensten, U.B. ; HelmBychowsk, K.M. ; Higuchi, G. ; Palumbie, S.R. ; Prager, E.M. ; Sage, R.D. and Stoneking, M. , 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biol. J. Linn. Soc. Vol. 26, pp.375-400.