

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 یاورى^۴، حسین ذوالقرنین^۵، عباس متین‌فر^۶

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

۳،۲- به ترتیب استادیار و مربی مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس بوشهر

۶- 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 شای میگو به عنوان الگو استفاده شد. قطعه‌ای از ژن 16S rRNA با آغازگرهای جهانی 16Sar/16Sbr تکثیر و از هر دو طرف تعیین توالی شد. نتایج حاصل از تعیین توالی نشان داد که قطعه تکثیر شده دقیقاً دارای ۵۶۱ جفت باز و غنی از AT (۶۶/۴ 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 دقیقاً 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 ۳/۹۰۶ 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 از سایر نشانگرهای ژنومیک و میتوکندریایی را مورد تأکید قرار می‌دهد.

واژه‌های کلیدی

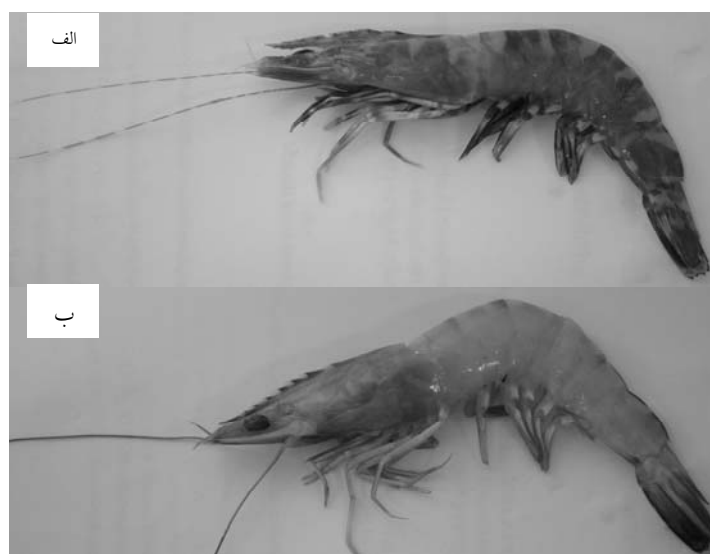
میگوی ببری سبز،
P.(Penaeus) semisulcatus
P.(penaeus) semisilcatus
persicus
خلیج فارس،
16S rRNA

مقدمه

میگوهای جنس *Penaeus* از متنوع‌ترین و فراوان‌ترین موجودات کف‌زی در آب‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری در سرتاسر جهان محسوب می‌شوند (۲۹). خصوصیات مورفولوژیکی در سطح زیادی برای شناسایی و تقسیم‌بندی سخت پوستان، خصوصاً میگوها به کار گرفته شده است (۶، ۲۷). خصوصیات مورفولوژیکی مشابه و غیر قابل تشخیص علی‌رغم 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 امکان‌پذیر است (۱۱).

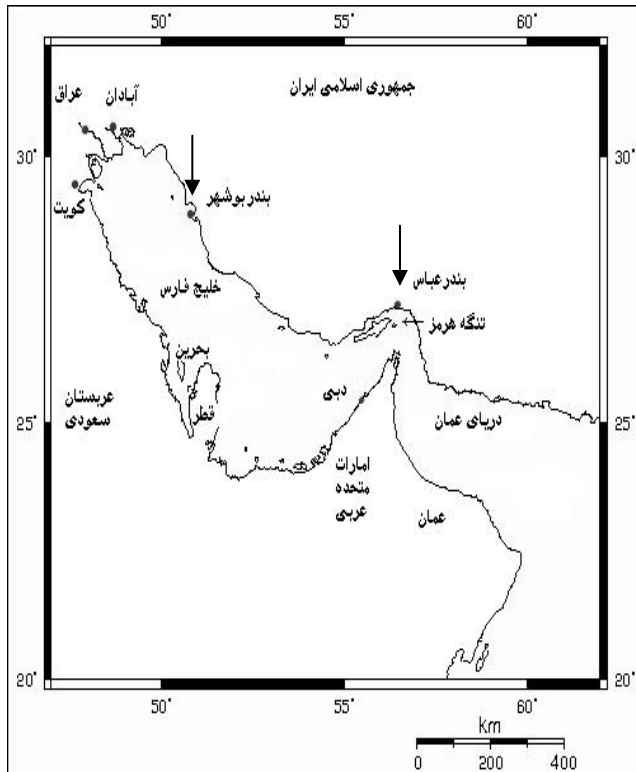
میگوی ببری سبز، *P.(penaeus) semisulcatus* De Haan (1844) به جنس *Penaeus* از خانواده *Penaeidea* تعلق دارد و یکی از با ارزش‌ترین گونه‌های جنس مذکور است. این گونه که اغلب آن را یکی از مرغوب‌ترین میگوهای خوراکی می‌دانند و ارزش اقتصادی بالایی دارد، بیش از ۹۰ درصد صید میگو در خلیج فارس را به خود اختصاص می‌دهد (۹). پراکنش جغرافیایی میگوی ببری سبز به عنوان یک گونه متعلق به آب‌های گرم، وسیع و پهنه آن از آفریقا تا استرالیا امتداد دارد (۵). علی‌رغم 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 دندان‌های روستروم، شکل آنتن شلاقی، کاراپاس و خصوصیات اندام‌های تناسلی نر و ماده بویژه اندام جنسی ماده (تلیکوم) مواردی هستند که برای مطالعه جمعیت‌های 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 (شکل ۱). 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.



شکل ۱- الگوی رنگ‌بندی بدن و آنتن شلاقی در گونه *P.(penaeus) semisulcatus* (الف) و زیر گونه *P.(penaeus) persicus* (ب)

semisulcatus persicus) (۵ قطعه متعلق به سواحل بوشهر و ۵ قطعه متعلق به سواحل بندرعباس) جمع آوری شد (شکل ۲). نمونه برداری در بوشهر و بندرعباس به ترتیب در شهریور و مهر ۱۳۸۷ انجام گرفت.



شکل ۲- جایگاه جمع آوری نمونه‌ها در خلیج فارس

DNA بافت ماهیچه ای پاهای شای میگو با استفاده از روش فنل/کلروفرم با اندکی تغییر (۲۱) و یا کیت استخراج DNA ژنومیک شرکت فرمتاز مطابق با کمی تغییر در دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده، استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش‌های اسپکتوفوتومتری 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')

سایر تفاوت‌ها عبارت از کوژ بودن روستروم در جایگاه دندان-های ۲-۴ 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 دندان 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 (۶). 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

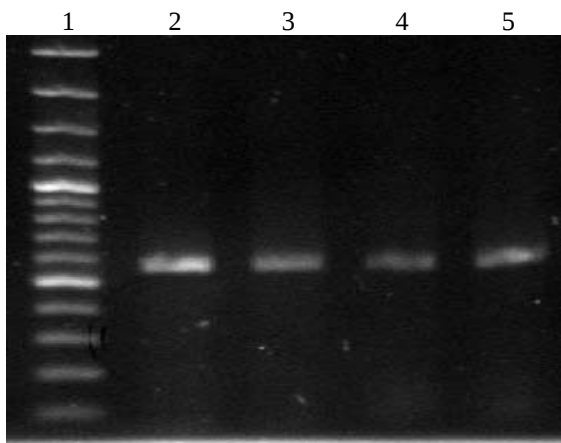
نمونه‌برداری و استخراج DNA

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)*

Kimura 2- Neighbor – joining (NJ) با استفاده از فاصله‌های parameter و با پشته‌توانه تکرار (bootstrap) ۱۰۰۰، حذف کامل Gap، در نظر گرفتن جهش‌های ترانزیشن و ترانسورژن، سرعت یکنواخت و الگوی هموزن 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. شکل ۳ الگوی حرکتی محصول PCR را در تعدادی از نمونه‌ها (نمونه شماره ۱ تا ۴ زیرگونه از بندرعباس) نشان می‌دهد.



شکل ۳- الگوی حرکتی حرکتی محصول PCR ژن *16S rRNA* در

تعدادی از نمونه‌ها: ۱- مارکر 100bp. 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 دقیقاً ۵۶۱ 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 دقیقاً با هم مطابقت دارند. همچنین در زیر گونه نیز توالی‌های *16S rRNA* از هر دو ناحیه بوشهر و بندرعباس دقیقاً با هم مطابقت دارند. ولی این توالی‌ها در گونه و زیر گونه تفاوت دارند. سپس

تکثیر اختصاصی بخشی 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: ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳ دقیقه)، در طی ۳۰ چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، ۵۱ درجه سانتی‌گراد ۴۵ 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 توالی‌های 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 (۲۴). 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 هموزن 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 (۲۴) 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

اولیه و مشاهدات چشمی، دقیقاً قطعه‌ی ۴۶۷ جفت بازی 16S rRNA از تحقیق حاضر (در این جا گونه با توجه مکان جمع‌آوری نمونه و معادل انگلیسی خلیج فارس با نام *P.(penaeus) semisulcatus* نشان داده شده است) و همه گونه‌های فوق برای بررسی فیلوژنتیکی مورد توجه قرار گرفت. نتایج هم‌ردیفی، ۸۱ جایگاه متنوع و ۳۶ جایگاه با اطلاعات فیلوژنتیک در شرایط پارسیمونی نشان داد. توالی‌های فوق غنی از AT (۶۶/۹ درصد) و نسبت جانیشینی ترانزیشن به ترانسورژن به طور متوسط ۱/۳۲۸ محاسبه شد. جدایی ژنتیکی میان توالی‌های فوق بسیار متنوع و از ۰/۰۱۱ میان *P.(marsupenaeus) japonicus* و *P.(penaeus) semisulcatus* تا ۰/۱۲۵ میان *P.(penaeus) semisulcatus* و *P.(litopenaeus) vannamei* محاسبه شد (جدول ۱). فاصله ژنتیکی متوسط نیز ۰/۰۷۰ 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 (۰/۰۴۰) است. درخت فیلوژنتیکی بر اساس آنالیز Neighbor-joining با استفاده از فاصله Kimura 2- parameter رسم شد (شکل ۵). درخت رسم شده بر اساس آنالیز فوق موید داده‌های جدول یک است.

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 (۶۶/۴ درصد) است. نتیجه هم‌ردیفی توالی 16S rRNA از گونه و زیر گونه مذکور نشان داد که ۱۸ جانیشینی بازی رخ داده است (شکل ۴). نسبت جانیشینی ترانزیشن به ترانسورژن با استفاده از نرم افزار MEGA، ۳/۹۰۶ محاسبه شد. فاصله ژنتیکی این دو نیز براساس Kimura 2- parameter، ۳/۳ 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 ۴۶۷ جفت باز است؛ لذا با استفاده از هم‌ردیفی

```

psper CGCCTGTTTA ACAAACAT 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 CCTATAAAG CTTGACAATA AGTCAATTAT ATTATAAATT GTTAGTGTA
psem .G...G... ..T.....A...

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

psper ATAACAAATA TAGTTGGTAT TTTATTGATC CTTTATTAAA GATTAAAGA 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 .

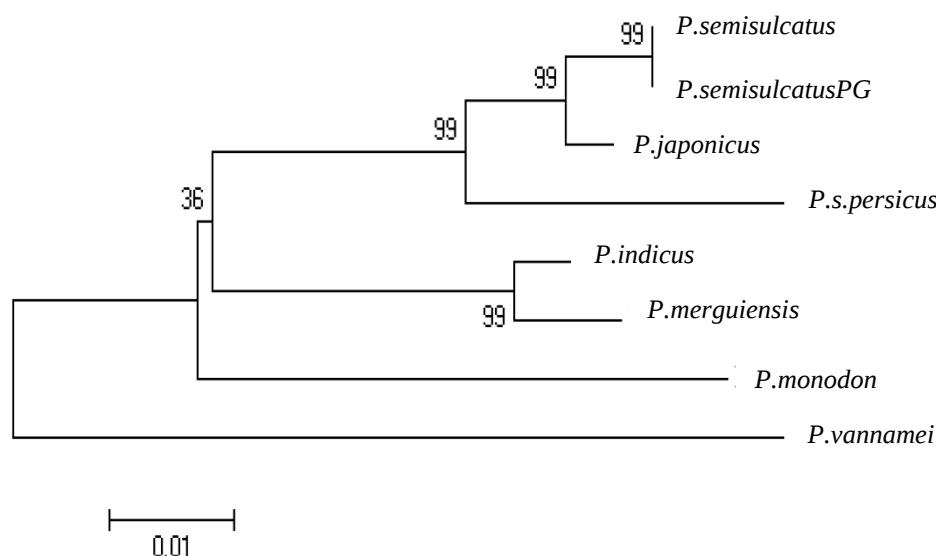
```

شکل ۴- هم‌ردیفی بخشی از توالی 16S rRNA در گونه (Psem) و زیر گونه (Psper).

جدول ۱- فاصله ژنتیکی میان *P.semisulcatus*PG 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. <i>P.indicus</i>							
2. <i>P.japonicus</i>	0.063						
3. <i>P.merguensis</i>	0.013	0.070					
4. <i>P.monodon</i>	0.073	0.072	0.075				
5. <i>P.semisulcatus</i>	0.066	0.011	0.073	0.080			
6. <i>P.semisulcatus</i> PG	0.066	0.011	0.073	0.080	0.000		
7. <i>P.s.persicus</i>	0.075	0.038	0.070	0.092	0.040	0.040	
8. <i>P.vannamei</i>	0.106	0.109	0.111	0.119	0.109	0.109	0.125



شکل ۵- 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.

Periclimenes inranatus و *Periclimenes oranatus* (۲۷)،

گونه‌های *Uca spinicarpa* و *Uca specios* از خرچنگ‌های پهن ویولون زن (۱۸)، میگوهای نقب زن گونه‌های *Alpheus* (۱۲) و دو وارسته 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 نسبتاً معیار دقیقی است، ولی معمولاً 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

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 وارسته 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

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 قبلاً نیز برای افراد این گونه در آب-های خلیج فارس و دریای عمان گزارش شده بود (۱). قبلاً 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. همدیفی اولیه ژن *16S rRNA* گونه از بوشهر و بندرعباس با همدیگر و همچنین همدیفی 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. جانشینی‌ها 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)* و *P. (marsupenaeus) japonicus* و *semisulcatus* ژنتیکی بیشتر میان *P. (penaeus) monodon* و *P. (penaeus)* است (جدول ۱). داده حاصل از این تحقیق، با نتایج سایر محققان در تضاد است. مثلاً 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 آنالیز توالی‌ها 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 وارسته مشابه مورفولوژیکی از گونه *P. (marsupenaeus) japonicus* — استفاده از *16S rRNA* یک درصد گزارش شده است. از طرف دیگر مطالعات فیلوژنتیکی نشان داد که این دو وارسته نسبت به سایر گونه‌های جنس *Penaeus* به هم نزدیک‌تر هستند و لذا این دو وارسته 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 (جدول ۱) حاکی از آن است که تفاوت مشاهده شده میان گونه و زیر گونه براساس *16S rRNA*، قابل توجه است.

زمان جدایی وارسته 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. احتمالاً 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، احتمالاً 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

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 آبرزی پرور، تابستان سال چهارم، صفحات ۴ تا ۷.
۲. متین فرع (۱۳۷۸) بررسی و تعیین گونه ای و شناسایی جمعیت های میگوی ببری سبز در آب های شمالی خلیج فارس. پایان نامه دوره دکتری دانشگاه آزاد اسلامیه، 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 identity in two penaeid shrimp species: *penaeus mondon* and *p. japonicus*. *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/tRNA^{Val} 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 genome of *Symphylella* sp. (Myriapoda: Symphyla): Extensive gene order rearrangement and evidence in favor of Progoneata. *Molecular phylogeny and Evolution* 49: 547-585.

(۱۷). تفاوت های ژنتیکی جمعیت های جانداران دریایی، بطور مستقیم وابسته به توانایی گسترش و پراکندگی آنها است، زیرا بجز جریان های دریایی یک طرفه، محیط های دریایی موانع فیزیکی برای جلوگیری از مهاجرت فراهم نمی کنند. 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 گونه زایی، مهاجرت به مکان های دیگر و تغییرات تدریجی طی صدها هزار سال است.

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

با توجه به مطالب فوق می توان الگوی زیر را برای تفاوت های 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 تفاوت های 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* می شناسیم تبدیل شده است.

سوالی که مطرح می گردد این است که آیا *P. (penaeus) semisulcatus persicus* - که در اینجا به عنوان زیر گونه در نظر گرفته شده است - در حقیقت جمعیتی جدا از *P. (penaeus)*

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. driven 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. Aquaculture 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 *Sceloporus* (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. Sombrook 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 fiddler 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 Preliminary 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. Marine 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 Biology 148: 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.

