دانشگاه هرمزگان
دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی
گروه شیلات

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد
در رشته مهندسی منابع طبیعی- تکثیر و پرورش آبزیان

عنوان

بررسی تنوع ژنتیکی میگوی سر تیز *Metapenaeus affinis* در خلیج فارس با استفاده از توالی یابی ژنوم میتوکندریایی

استاد راهنما:
دکتر ایمان سوری نژاد

اساتید مشاور:
دکتر سعید تمدنی جهرمی
دکتر آرش اکبرزاده

نگارش:
فاطمه شهرانی کرانی

اسفند ۱۳۹۲

تقدیم

به روح بلند شهید بزرگوار سردار وهاب شهرانی

چکیده

میگوی سر تیز *Metapenaeus affinis* از مهم ترین گونه های میگوی خانواده پنائیده در خلیج فارس است که پس از گونه میگوی موزی رتبه دوم صید را در استان هرمزگان به خود اختصاص می دهد. با توجه به اهمیت میگوی سر تیز در چرخه صید و صیادی این استان، تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی این گونه در خلیج فارس با استفاده از توالی یابی ژن میتوکندریایی SrRNA۱٦ برای اولین بار بررسی شد. تعداد ۱۸ عدد میگو از سه منطقه بندرعباس، بوشهر و خوزستان (از هر منطقه ۶ نمونه) جمع آوری شد. استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم انجام شد و با بهینه سازی واکنش PCR جهت تکثیر ژن مذکور، مناسب ترین دما برای اتصال آغازگر دمای ۴۸ درجه سانتیگراد به دست آمد. نتایج توالی یابی ژن SrRNA۱٦ در ۱۸ میگوی نمونه برداری شده که شامل ۴۸۶ باز همردیف شده بود، ۴۸۰ جایگاه ژنی مونومورف، شش جایگاه ژنی پلی مورف و دو جایگاه انتقالی نشان داد. هیچ گونه چند شکلی اضافه و حذف مشاهده نشد. تعداد چهار هاپلوتیپ از ۱۸ نمونه مورد مطالعه به دست آمد. میانگین تنوع هاپلوتیپی برای نمونه های هر منطقه از ۰/۰۰۰ ± ۰/۰۰۰ (بندرعباس) تا ۰/۲۱۵ ± ۰/۳۳۳ (بوشهر) و ۰/۲۱۵± ۰/۳۳۳ (خوزستان) و میانگین تنوع نوکلئوتیدی برای نمونه های هر منطقه از ۰/۰۰۰ ± ۰/۰۰۰ (بندرعباس) تا ۰/۰۰۳ ± ۰/۰۰۳ (بوشهر) و ۰/۰۰۱± ۰/۰۰۱ (خوزستان) به دست آمد. میانگین تنوع هاپلوتیپی بین سه منطقه ۰/۰۰۷ ± ۰/۶۰۸ و میانگین تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۳ ± ۰/۰۰۲ محاسبه شد. بیشترین مقدار تمایز جمعیتی محاسبه شده، بین جمعیت بندرعباس و خوزستان (۰/۷۵۰) و کمترین مقدار تمایز جمعیتی هم بین مناطق بوشهر و خوزستان (۰/۱۰۵-) به دست آمد. در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت جمعیت میگوی سر تیز منطقه بندرعباس با دو منطقه بوشهر و خوزستان معنی دار بود ولی بین دو منطقه بوشهر و خوزستان با یکدیگر معنی دار نبود. آزمون تفاوت جمعیت (non-differentiation exact p values) در داخل جمعیت ها در سطح احتمال ۰/۰۵ وجود تفاوت بین جمعیت میگوی سر تیز بندرعباس با دو منطقه دیگر را مورد تأیید قرار داد. میانگین آزمون های بی طرفی تاجیما و شاخص Fu's FS برای ۱۸ توالی بین مناطق به ترتیب ۰/۸۲۳- و ۱/۱۸۱ محاسبه شد که هر دو شاخص از لحاظ آماری معنی دار نبودند (p>۰/۰۵). درخت های تکاملی رسم شده با درصد بالایی جدایی جمعیتی منطقه بندرعباس را از دو منطقه دیگر نشان دادند. نتایج این بررسی با استفاده از روش توالی یابی ژن SrRNA۱٦ نشان داد که جمعیت میگوی سر تیز منطقه بندرعباس یک خزانه ژنی مستقل و جداگانه از دو منطقه دیگر می باشد و علیرغم احتمالاً یکی بودن جمعیت های آن در مناطق بوشهر و خوزستان، تنوع مولکولی این گونه در این دو منطقه در حد قابل قبول می باشد.

واژه های کلیدی: تعیین توالی، ساختار جمعیت، خلیج فارس، SrRNA۱٦، میگوی سر تیز *Metapenaeus affinis*

تقدیر و تشکر

سپاس و ستایش مر خدای را جل و جلاله که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، درفشان. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید.

و به مصداق آیه من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق بر خود می دانم از استاد گرانقدر جناب دکتر ایمان سوری نژاد، که در تدوین و تهیه مطالب این تحقیق بنده را یاری نموده و زحمات بسیاری کشیده اند تشکر کنم. همچنین سپاس فراوان به حضور جناب دکتر سعید تمدنی و جناب دکتر آرش اکبرزاده را تقدیم می دارم.

در پایان از خانواده عزیزم که در مسیر انجام این تحقیق صبوری به خرج داده و از هیچ لگی فروگذار نکردند ممنون و سپاسگذارم.

فهرست مطالب

فصل اول ۱
مقدمه ۲
۱-۱-۱ سوالهای اصلی تحقیق ۵
۱-۱-۲ اهداف ۵
۱-۱-۳ فرضیات ۵
۱-۲ کلیات ۵
۱-۲-۱ مروری بر میگوهای خانواده پنائیده ۵
۱-۲-۲ رده بندی و پراکنش میگوی سر تیز ۶
۱-۲-۳ مشخصات ریخت شناسی میگوی سر تیز ۶
۱-۲-۴ اکولوژی و مهاجرت در گونه های میگوی خانواده پنائیده ۷
۱-۲-۵ جمعیت و ساختار جمعیت، ژنتیک جمعیت ۸
۱-۲-۶ تنوع و فاصله ژنتیکی ۹
۱-۲-۷ mtDNA ۱۰
۱-۲-۸ استخراج DNA ۱۱
۱-۲-۹ واکنش زنجیره ای پلیمراز ۱۱
۱-۲-۹-۱ کاربردهای مهم PCR ۱۳
۱-۲-۹-۲ مراحل PCR ۱۳
۱-۲-۹-۳ انواع PCR ۱٤
۱-۲-۹-۴ آلودگی PCR و راه حل آن ۱۵
۱-۲-۱۰ توالی‌یابی ۱۶
۱-۲-۱۰-۱ روش خاتمه زنجیره ۱۶
۱-۲-۱۰-۲ مزیت روش خاتمه زنجیره ۱۷
۱-۲-۱۰-۳ روش تجزیه شیمیایی DNA ۱۷
۱-۲-۱۰-۴ معایب روش تجزیه شیمیایی ۱۸
فصل دوم ۱۹
۲-۱ مروری بر برخی مطالعات توالی یابی در خارج از کشور ۲۰
۲-۲ مروری بر برخی مطالعات توالی یابی در ایران ۲۱
فصل سوم ۲۳

۳-۱ مواد ۲۴
۳-۱-۱ مواد و وسایل مورد نیاز جهت استخراج DNA و بررسی کمیت وکیفیت آن، PCR و الکتروفورز ۲۴
۳-۱-۲ بافرها و محلول های مورد استفاده در استخراج DNA ۲۴
۳-۱-۳ آنزیم ها ۲۴
۳-۱-۴ دستگاه های مورد استفاده جهت استخراج DNA و PCR ۲۴
۳-۱-۵ سایر وسایل و تجهیزات مورد نیاز ۲۵
۳-۱-۶ نرم افزارهای مورد استفاده ۲۵
۳-۱-۷ آغازگرها ۲۵
۳-۲ روش کار ۲۶
۳-۲-۱ نمونه برداری ۲۶
۳-۲-۲ تهیه و آماده سازی بافرها و محلول ها ۲۶
۳-۲-۲-۱ تهیه Extraction buffer ۲۶
۳-۲-۲-۲تهیه بافر STE ۲۷
۳-۲-۲-۳ ساخت بافر TAE (۱۰x) ۲۷
۳-۲-۲-۴ ساخت بافر TBE (۱۰x) ۲۷
۳-۲-۲-۵ ساخت لودینگ بافر (Loading Buffer) ۲۷
۳-۲-۲-۶ ساخت SDS (سدیم دودسیل سولفات) ۱۰ درصد ۲۷
۳-۲-۲-۷ آماده سازیLadder ۲۷
۳-۲-۳ استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم ۲۸
۳-۲-۴ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۲۹
۳-۲-۴-۱ روش اسپکتروفتومتری ۲۹
۳-۲-۴-۲ روش الکتروفورزی ۳۰
۳-۲-۵ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۳۰
۳-۲-۶ترکیبات واکنشPCR ۳۱
۳-۲-۷ تعیین توالی محصول PCR ۳۱
۳-۲-۸ آنالیز توالی ها ۳۲
فصل چهارم ۳۳
۴-۱ کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۳۴

۴-۱-۱ ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز ۳۴
۴-۱-۲ ارزیابی کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری ۳۴
۴-۲ تکثیر و مقایسه توالی‌های 16 SrRNA ۳۴
۴-۲-۱ تکثیر ژن 16 SrRNA ۳۴
۴-۲-۲ نتایج حاصل از تعیین توالی ژن 16 SrRNA ۳۵
۴-۲-۳ هم ردیفی توالی‌های بازسازی شده با استفاده از Clustal W ۳۵
۴-۲-۴ هاپلوتیپ و ترسیم درخت تکاملی ۳۷
۴-۲-۵ تنوع ژنتیکی و تفاوت جمعیتی ۳۹
فصل پنجم ۴۴
بحث ۴۵
۵-۱ استخراج DNA ۴۶
۵-۲ ردیف کردن توالی‌های نوکلئوتیدی ۴۶
۵-۳ تنوع ژنتیکی ۴۷
۵-۴ بررسی های جمعیتی (فاکتور Fst، آزمون exact test، تست تاجیما، تست Fu's FS) ۴۹
۵-۵ آزمون فرضیات ۵۵
۵-۶ پیشنهادات ۵۶
منابع ۵۷
چکیده انگلیسی ۶۲
عنوان انگلیسی ۶۳

فهرست جداول

عنوان شماره صفحه

جدول ۳-۱ مواد مورد استفاده در استخراج DNA..... ۲۴
جدول ۳-۲ بافرها و محلول های مورد استفاده در استخراج DNA..... ۲۴
جدول ۳-۳ دستگاه های مورد استفاده جهت استخراج DNA و PCR..... ۲۴
جدول ۳-۴ آغازگر مورد استفاده در PCR ژن 16 SrRNA گونه میگوی سر تیز ۲۵
جدول ۳- ۵ برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن 16 SrRNA..... ۳۱
جدول ۳-۶ ترکیبات واکنش PCR ۳۱
جدول ۴-۱ پراکنش هاپلوتیپی ژن 16 SrRNA میگوی سر تیز..... ۳۷
جدول ۴-۲ تنوع ژنتیکی ژن 16 SrRNA میگوی سر تیز در مناطق مورد مطالعه..... ۴۰
جدول ۴-۳ ترکیب نوکلوتیدی توالی های ژن 16 SrRNA میگوی سر تیز در مناطق مورد مطالعه..... ۴۰
جدول ۴-۴ تست گسترش و پراکندگی ژن 16 SrRNAمیگوی سر تیز در مناطق مورد مطالعه ۴۱
جدول ۴-۵ میزان Fst بر اساس فراوانی هاپلوتیپی (مثلث پایین) و میزان p-value (مثلث بالا) ژن 16 SrRNA میگوی سر تیز بین مناطق مورد بررسی..... ۴۲
جدول ۴-۶ ماتریکس معنی دار بودن میزان Fst و میزان p-value ژن 16 SrRNA میگوی سر تیز بین مناطق مورد بررسی در سطح احتمال ۰/۰۵..... ۴۲
جدول ۴-۷ میزان p-value آزمون تفاوت ژن 16 SrRNA جمعیت های میگوی سر تیز بین مناطق مورد بررسی..... ۴۲
جدول ۴-۸ ماتریکس معنی دار بودن میزان p-value آزمون تفاوت ژن 16 SrRNA میگوی سر تیز بین مناطق مورد بررسی در سطح احتمال ۰/۰۵..... ۴۳

فهرست شکل ها

عنوان شماره صفحه

شکل ۱-۱ نمای کلی بدن میگوی سر تیز *Metapenaeus affinis* (H. Milne Edwards, 1837) ۷
شکل ۱-۲ چرخه زندگی میگوهای خانواده پنائیده..... ۸
شکل ۳-۱ مناطق نمونه برداری از میگوی سر تیز در خلیج فارس..... ۲۶
شکل ۴-۱ الکتروفورز DNA استخراج شده به روش فنل کلروفرم از پای شنای میگوی سرتیز ۳۴
شکل ۴-۲ الگوی باندی محصول PCR ژن 16 SrRNA روی ژل آگارز یک درصد..... ۳۵
شکل ۴-۳ همردیفی توالی‌های 16SrRNAگونه میگوی سر تیز در در مناطق بندرعباس BA، بوشهر BU و خوزستان KU..... ۳۶
شکل ۴-۴ درخت تکاملی ژن 16 SrRNA میگوی سر تیز به روش Neighbor-Joining ۳۸
شکل ۴-۵ درخت تکاملی ژن 16 SrRNA میگوی سر تیز به روش UPGMA ۳۸
شکل ۴-۶ درخت تکاملی ژن 16 SrRNA میگوی سر تیز به روش Maximum parsimony ۳۹

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه

تحقیقات در زمینه ژنتیک و زیست فناوری در آبزیان رشد پیوسته خود را از اواسط دهه ۱۹۸۰ آغاز کرده است و در حال حاضر تحقیقات در این زمینه بسیار فعال است. از جمله مهمترین زمینه‌های فعالیت تحقیقات ژنتیک آبزیان می‌توان به استفاده از اصول ژنتیک و زیست فناوری به وسیله مدیران شیلاتی و محققان جهت افزایش میزان صید طبیعی، مدیریت صحیح ذخایر آبزیان، مدیریت تکثیر و پرورش در قفس و یا محیط مصنوعی، بازسازی جمعیت های بومی و حفاظت از ذخیره ژنی و تنوع ژنتیکی در منابع طبیعی و گونه های در معرض انقراض اشاره نمود (دانهام[1]، ۲۰۰۴).

دانستن ساختار ژنتیکی آبزیان و تمایز جمعیتهای متفاوت و آگاهی از تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی برای حفاظت از گونه ها بسیار حائز اهمیت بوده و به عنوان اولین پیش نیاز برای حفظ جمعیت ها و تنوع زیستی و سازگاری آنها در شرایط محیطی در حال تغییر قلمداد می گردد. دانش ژنتیک از چندین راه به حفاظت تنوع زیستی که از مهمترین چالش های حاضر است و برداشت بهینه منابع شیلاتی کمک می نماید. این دانش می تواند از طریق شناسایی جمعیت هایی که دارای تنوع ژنتیکی بالا یا تقلیل یافته اند به کاهش خطر انقراض کمک کند. مطالعات ژنتیک جمعیت همچنین می‌تواند رهنمودهایی برای بهبود ساختار جمعیت و درک بیولوژی گونه های مورد بررسی ارائه دهد (دیز و پرسا[2]، ۲۰۰۹).

شناسایی ژنتیکی ذخایر یکی از اولویت های مهم به منظور یافتن منابع طبیعی بکر در جهت اطمینان از به گزینی گونه ها می باشد. ذخایر گوناگون اغلب روند یکسانی از رشد، مقاومت در برابر بیماری یا نشان دادن خصوصیت های مهم از خود بروز نمی دهند (لستر و پانته[3]، ۱۹۹۲). اطلاعات در زمینه این خصوصیات و ارتباط آنها با ژنوتیپ های مشخص در جهت بهبود برنامه ها و توسعه سیستم تکثیر و پرورش گونه های مورد مطالعه موثر می باشد.

تمایز جمعیتهای متفاوت آبزیان به سه روش متداول مانند استفاده از ویژگیهای ریخت شناسی، نشانگرهای پروتئینی و مولکولی (DNA و mtDNA) انجام می گیرد. اکنون مشخص شده است که ژنوم موجودات به طور طبیعی دارای تفاوتهایی در ردیف بازهای آلی می باشند. مواد ژنتیکی اعم از کروموزومی یا خارج کروموزومی در معرض تغییرات و جهش های دائمی قرار دارند و عوامل فیزیکی و شیمیایی، از درون سلول و یا بیرون از ارگانیسم، در هنگام همانندسازی باعث جابجایی در ترتیب نوکلئوتیدهای DNA می گردند. بنابراین در گونه های جانوری یا گیاهی، جمعیتها و نژادهای متفاوتی ایجاد می گردد که شناسایی آنها از روی صفات ظاهری امکان پذیر نیست. این تغییرات طبیعی که سبب گوناگونی در افراد یک جمعیت می شود پلی مورفیسم نام دارد. روش استفاده از تفاوت در توالی های DNA از دقیق ترین

[1] Dunham
[2] Diz and Persa
[3] Lester and Pante

روشها در طبقه بندی موجودات بوده و دور از هرگونه خطا است و امروزه نشانگرهای DNA به ابزاری قابل اعتماد در مطالعات تنوع گونه ای تبدیل شده است (تمپلتون[1]، ۲۰۰۲).

به طور معمول 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 می باشند ولی می‌توانند به عنوان ملاکی جهت بررسی فاصله ژنتیکی و زمان اشتقاق دو گونه از یکسو و بازسازی و مدل سازی تاریخچه تکاملی و رابطه جدی- فرزندی و در نهایت ترسیم درخت فیلوژنی احتمالی آنان مورد استفاده قرار گیرند (کرونین[2] و همکاران، ۱۹۹۴). این تفاوت‌ها از دو راه بر مبنای مطالعات مولکولی قابل تشخیص‌اند، در یک روش بطور مستقیم توالی قطعه مورد نظر تعیین می گردد (Sequencing) و روش دیگر آن است که این اختلافات بطور غیر مستقیم با استفاده از روش RFLP آشکار گردد. توالی‌یابی به تعیین ردیف قرارگیری نوکلئوتیدها در یک مولکول DNA یا RNA و یا تعیین ردیف قرارگیری اسیدهای آمینه در یک زنجیره پلی‌پپتیدی اطلاق می شود.

ژنوم میتوکندریایی یا mtDNA به طور گسترده ای در بررسی جمعیت های گونه های مختلف آبزیان مورد استفاده قرار می گیرد و کارایی خوبی در بررسی تنوع ژنتیکی و جداسازی جمعیت ها دارد. ژنوم میتوکندری از طریق مادری به ارث میرسد و بنابراین پدیده کراسینگ اور و نوترکیبی در آن صورت نمی گیرد. این خاصیت باعث بروز اختلاف ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته شده است و از این رو برای تشخیص گروه هایی از موجودات که برای سالها از هم جدا بوده اند نشانگر خوبی می باشد (بربی[3]، ۱۹۹۶). ژن 16sRNA یکی از نواحی بسیار متغیر در ژنوم میتوکندریایی می باشند که می توان با استفاده از تکنیک توالی یابی این ناحیه تنوع ژنتیکی را بررسی نمود.

توالی یابی ژنوم میتو کندریایی (mtDNA sequencing) یکی از پرکاربردترین روشها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی (شجره شناسی ژنتیکی) و فیلوژئوگرافی (شجره شناسی جغرافیایی) بین جمعیت ها و گونه های نزدیک به هم محسوب می شود (بروفورد[4] و همکاران، ۲۰۰۳). توالی یابی میتوکندریایی با مقایسه نوکلئوتیدها و مشخص شدن اختلاف بین توالی های مختلف تعیین می گردد. ژنوم میتو کندری هر گونه از بی مهرگان که تا به امروز مورد بررسی قرار گرفته است با گونه دیگر متفاوت بوده است. همه این تنوع ها منعکس کننده تکامل میتوکندری در موجودات بوده و می توان نحوه تکامل موجودات را با استفاده از توالی یابی ژنوم میتوکندری آنها بررسی نمود (تجنسول[5] و همکاران، ۲۰۰۸). روشن است که

[1] Templeton
[2] Cronin
[3] Berrebi
[4] Bruford
[5] Tjensvoll

در بسیاری از گونه های ماهیان mtDNA دارای تغییرات قابل ملاحظه ای بوده و این تغییرات را می توان مبنای تفکیک ذخایر قرار داد (برون[1] و همکاران، ۲۰۰۸).

میگوی سفید یا سر تیز *Metapenaeus affinis* (H. Milne Edwards, 1837) یکی از گونه های مهم میگو در آب های استان هرمزگان به شمار می رود که هر ساله در فصل صید میگو از لحاظ میزان صید رتبه دوم بعد از میگوی موزی را به خود اختصاص می دهد و ذخایر آن در معرض برداشت بی رویه قرار دارد (صفایی، ۱۳۹۱). این میگو متعلق به خانواده Penaeidae و جنس Metapenaeus می باشد. میگوی سر تیز دارای ۱۱-۸ عدد دندانه روی رستروم بوده و تلسون آن فقط مجهز به خار انتهایی می باشد. بدن به رنگ سبز کم رنگ تا صورتی کم رنگ، شاخک های حسی قرمز رنگ، پاهای حرکتی سفید و یا هم رنگ بدن و پاهای شنا مایل به صورتی تا سفید می باشند. اندازه نرها به ۱۴/۶ سانتی متر و ماده ها به ۱۸/۶ سانتی متر هم می رسد. این گونه معمولاً در نواحی ساحلی و تا عمق ۵۵ متر مشاهده می گردد و بستر گلی یا گلی- شنی را ترجیح می دهد (فیشر و بیانچی[2]، ۱۹۸۴).

تکثیر مصنوعی یک گونه به منظور بازسازی ذخایر و پرورش، بدون دانستن ساختار جمعیتی و تنوع ژنتیکی مولدین باعث انتخاب نامناسب مولدین از جمعیت های مختلف خواهد شد که این امر در نهایت از بین رفتن ساختارهای ژنتیکی گونه ها و کاهش تنوع ژنتیکی، بالا رفتن آسیب پذیری گونه ها نسبت به شرایط محیطی و از بین رفتن جمعیت ها را به دنبال خواهد داشت.

از آنجا که اطلاعات در مورد ساختار ژنومیک این گونه در حال حاضر کم می باشد در این پروژه با استفاده از روش توالی یابی ژنوم میتوکندریایی ساختار جمعیتی این گونه در خلیج فارس بررسی می شود. در این تحقیق با بررسی تنوع ژنتیکی میگوی سفید در خلیج فارس و به دست آوردن اطلاعات از ساختار ژنومی گونه و شناخت پارامترهای مختلف تنوع ژنتیکی جمعیت میتوان مدیریت مناسب تری را برای برنامه های بلند مدت حفظ و ارزیابی ذخایر، ارزیابی وضعیت زیست شناختی و بوم شناختی گونه و به دنبال آن برنامه های تکثیر و پرورش اعمال نمود. آگاهی از میزان ذخایر ژنتیکی این گونه جهت مدیریت ذخایر آن الزامی بوده و با توجه به لزوم مولدسازی در تکثیر و پرورش این گونه در آینده نزدیک، آگاهی از ساختار جمعیتی این گونه به منظور تولید مولدین مناسب با ضریب رشد بالا و درصد بقای بالای لاروی که از مناطق مختلف با توجه به ذخایر ژنتیکی این گونه برداشت می شوند لازم و اساسی به نظر می رسد.

[1] Brown
[2] Fischer and Bianchi

۱-۱-۱ سوالهای اصلی تحقیق

۱- میگوی سر تیز دارای چه میزان تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی در مناطق مختلف نمونه برداری در خلیج فارس با استفاده از توالی‌یابی ژن میتوکندریایی 16SrRNA می‌باشد؟

۲- تمایز ژنتیکی میگوی سر تیز در بین مناطق مختلف نمونه برداری در خلیج فارس با استفاده از توالی‌یابی ژن میتوکندریایی 16SrRNA به چه میزان است؟

۱-۱-۲ اهداف

۱- تعیین میزان تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی میگوی سر تیز با استفاده از توالی‌یابی ژن میتوکندریایی 16SrRNA در مناطق مورد مطالعه

۲- شناسایی جمعیت‌های احتمالی مجزا از نظر ژنتیکی و تعیین میزان تمایز ژنتیکی میگوی سر تیز در مناطق مورد مطالعه

۱-۱-۴ فرضیات

۱- میگوی سر تیز دارای تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بالایی در مناطق نمونه برداری در خلیج فارس با استفاده از توالی‌یابی ژن میتوکندریایی 16SrRNA می‌باشد.

۲- میزان بالایی از تمایز ژنتیکی بین جمعیت های میگوی سر تیز در مناطق نمونه برداری در خلیج فارس با استفاده از توالی‌یابی ژن 16SrRNA میتوکندریایی وجود دارد.

۱-۲ کلیات

۱-۲-۱ مروری بر میگوهای خانواده پنائیده

از حدود ۲۵۰۰ گونه میگوی شناخته شده، کمتر از ۳۰۰ گونه دارای ارزش تجاری هستند. بیشترین میگوهای دریایی که مورد بهره برداری انبوه قرار می گیرند از خانواده پنائیده می باشند و مناسب ترین گونه های پرورشی نیز عمدتاً از همین خانواده و اکثراً متعلق به جنس Penaeus هستند.

یکی از تفاوت های عمده بین مراحل لاروی، نوجوانی و بزرگسالی میگوهای پنائیده به نوع زیستگاه آنها (مصب، دوری یا نزدیکی به ساحل) مربوط می شود. مراحل مختلف زیستی میگوهای Penaeus به جهت چرخه زندگی پیچیده در زیستگاه های مختلف طی می شود و مهاجرت جزء ضروری از زندگی آنهاست. الگوهای مهاجرت میگوهای پنائیده در مناطق ساحلی با مهاجرت و ورود به مناطق کم عمق

ساحلی و مصبی آغاز شده که بعد از آن از این زیستگاه خارج شده و جهت تولیدمثل وارد آبهای عمیق تر می شوند. تغییرات و نوسانات مشاهده در مراحل مختلف تکامل میگوهای پنائیده تابع این سیکل زندگی است.

۱-۲-۲ رده بندی و پراکنش میگوی سر تیز

میگوی سر تیز *Metapenaeus affinis* (H. Milne Edwards, 1837) با نام انگلیسی Jinga shrimp رتبه دوم صید را در استان هرمزگان پس از گونه میگوی موزی دارا می باشد (صفایی، ۱۳۹۱).
رده بندی این گونه به صورت ذیل می باشد (www.marinespecies.org):

Kingdom: Animalia
Phylum: Arthropoda
Subphylum: Crustacea
Class: Malacostraca
Subclass: Eumalacostraca
Superorder: Eucarida
Order: Decapoda
Suborder: Dendrobranchiata
Superfamily: Penaeoidea
Family: Penaeidae
Genus: Metapenaeus
Species: *Metapenaeus affinis* (H. Milne Edwards, 1837)

میگوهای خانواده پنائیده در آبهای استوایی و نیمه استوایی در سراسر جهان یافت می شوند. پراکنش گونه میگوی سر تیز در آبهای خلیج فارس و دریای عمان تا آبهای جنوبی هند و همچنین در آبهای سریلانکا می باشد. پراکنش آنها در شرق تا آبهای فیلیپین و جزیره تایوان نیز ادامه می یابد. میگوی سفید در سراسر خلیج فارس در مناطق خوزستان، بوشهر و هرمزگان پراکنش دارد.

۱-۲-۳ مشخصات ریخت شناسی میگوی سر تیز

رنگ عمومی بدن این میگو سبز کم رنگ تا صورتی کم رنگ و گاهی متمایل به قهوه ای است. قسمت انتهایی بدن به رنگ قرمز می باشد. پاهای شنا مایل به صورتی تا سفید، دم پاره ها سبز و انتهای آن سفید متمایل به زرد است. شاخک های حسی قرمز رنگ بوده و پاهای حرکتی سفید و یا همرنگ بدن می باشند.

آنتن ها نسبتاً بلند و زاویه دار و به رنگ قرمز می باشند. روستروم بلند و نوک تیز بوده و قسمت بالایی آن دارای ۸ تا ۱۱ دندانه و قسمت پائینی فاقد دندانه است. رنگ نوک اندام یوروپود معمولاً سفید یا

زرد متمایل به سبز می باشد. برجستگی Postrostral تقریباً تا انتهای خلفی کاراپاس (سرسینه) ادامه دارد و تلسون فقط مجهز به خار انتهایی می باشد. دومین تا چهارمین پای حرکتی فاقد پای خارجی می باشد. در جنس نر، قطعه انتهایی میانی پتاسما (اندام تناسلی) هلالی شکل بوده به طوری که تمام یا قسمتی از قطعه انتهایی جانبی را می پوشاند.

در جنس ماده، صفحه قدامی از تلیکوم (اندام تناسلی) دارای شیار عمیق طولی بوده و به طور قابل ملاحظه ای پهن تر از صفحه خلفی می باشد (شکل ۱-۱). همانند سایر گونه های پرورشی، ماده ها از نرها بزرگترند. حداکثر طول ماده ها ۱۹ و نرها ۱۵ سانتی متر است (FAO, 1985).

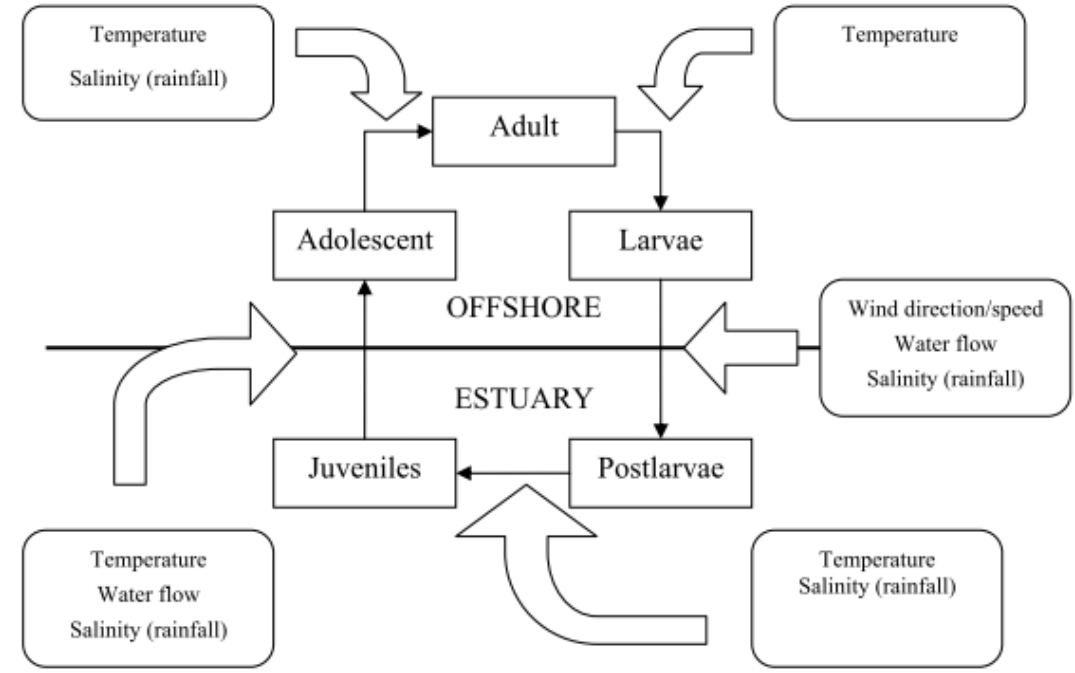
شکل ۱-۱ نمای کلی بدن میگوی سر تیز *Metapenaeus affinis* (H. Milne Edwards, 1837)

۱-۲-۴ اکولوژی و مهاجرت در گونه های میگوی خانواده پنائیده

میگوهای خانواده پنائیده در دریا تخم ریزی نموده و لاروهای خارج شده از تخم از مناطق دریایی به مناطق ساحلی و خوریات پوشیده از جنگل های حرا مهاجرت می کنند. مهم ترین مکانیزم مهاجرت لارو میگو از دریا به مناطق ساحلی و خوریات حرا، جریانهای دریایی است. معمولاً در این حالت شرایط محیطی مانند درجه حرارت، شوری و بارندگی بر اندازه و فراوانی میگوها در این مناطق تاثیر گذار هستند. لاروها در خوریات در زیر درختان حرا و کنار ریشه های هوایی قرار می گیرد و از فیتوپلانکتونها (مانند دیاتومه ها)، ذرات دیتریت، ماکروفیت‌ها، روزنه داران، کرمهای حلقوی، پرتاران، نرمتنان و سخت پوستان کوچک تغذیه می کند. میگوها بین یک تا دو ماه در خوریات مانده و سپس به سوی سواحل شنا کرده و

بعد از رسیدن به سن بلوغ به شکل گله های بزرگ، سواحل را به سمت دریای آزاد ترک می کنند (گارسیا و رست[1]، ۱۹۸۱)(شکل ۱-۲).

جمعیت میگوها از زمان لاروی به علت تغییرات محیطی و شکار شدن به وسیله سایر آبزیان به شدت کاهش می یابد. از طرفی وزن هر میگو با افزایش سن بیشتر می گردد. بنابراین میزان توده زنده (بیوماس) که حاصل تعداد میگوها در وزن آنها می باشد تا یک سن مشخص بیشتر شده و سپس کاهش می یابد. این سن به عنوان سن بحرانی شناخته می گردد و چنانچه سن ذخیره آبزی از آن بگذرد توده زنده کاهش خواهد یافت. زمان آزاد سازی فصل صید دقیقاً در زمان این سن بحرانی آغاز می گردد.



شکل ۱-۲ چرخه زندگی میگوهای خانواده پنائیده

۱-۲-۵ جمعیت و ساختار جمعیت، ژنتیک جمعیت

یک جمعیت اجتماع محلی یک گونه دارای تولید مثل جنسی است که در آن افراد، دارای خزانه ژنی مشترکی هستند. عموماً اصطلاح جمعیت به جوامعی اطلاق می شود که دارای تولید مثل جنسی تصادفی باشند. از آنجا که جمعیت ها ممکن است تبادلاتی با هم داشته باشند، این امکان وجود دارد که تمایز ژنتیکی بین جمعیت ها وجود نداشته باشد به استثنای جمعیت هایی که به طور آشکار از نظر جغرافیایی

[1] Garcia

از هم جدا هستند و هیچ ارتباطی با هم ندارند. به عبارت دیگر در مواردی موانع تولید مثلی پنهانی وجود دارد که از تبادلات ژنتیکی بین جمعیت جلوگیری می کند. علاوه بر این، در طول چرخه زندگی یک گونه، ممکن است اعضای یک جمعیت به طور فیزیکی با اعضای دیگر جمعیت ها مخلوط شوند. بدین ترتیب ساختار جمعیتی یک گونه می تواند یک جمعیت تولید مثلی منفرد، جمعیت های متعدد مجزا که تنها گاهی با هم تبادلات گامتی دارند ولی در اصل به وسیله فاصله جغرافیایی از هم جدا هستند، جمعیت هایی که در کنار هم زندگی می کنند ولی از نظر تولید مثلی مجزا هستند و یا ترکیبی از تمام حالات بالا باشد. ژنتیک جمعیت به بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت و به عبارت دیگر به فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی و قوانین حاکم بر تغییرات آن‌ها می‌پردازد. ژنتیک جمعیت علم مطالعه تنوع ژنتیکی در جمعیت‌هاست. این علم تنوع حاصل از عواملی همچون انتخاب، جهش، نوترکیبی، جریان تصادفی ژنی و اندازه موثر جمعیت را پیش بینی می‌کند.

۱-۲-۶ تنوع و فاصله ژنتیکی

همانگونه که بیان شد تنوع ژنتیکی، قابلیت بقای یک گونه یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییرات محیطی فراهم می‌کند و بنابراین وجود تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی مدت یک گونه ضروری است (باتیلون[1] و همکاران، ۱۹۹۶). در واقع تنوع ژنتیکی از تفاوت در توالی نوکلئوتیدهای DNA در بین افراد حاصل می‌شود و می‌توان آن را توسط نشانگرهای ژنتیکی اندازه‌گیری کرد. ضرورت بررسی تنوع ژنتیکی از این جهت است که جهت برآورد اندازه موثر جمعیت، بررسی تکاملی جمعیت ها، تعیین ساختار جمعیت، چگونگی اثر انتخاب بر ژنها، تعیین جایگاه ژنی صفات کمی و.... کاربرد دارد که اهمیت آن در مطالعات آبزیان پیش تر توضیح داده شد.

فاصله ژنتیکی اشاره به واگرایی ژنتیکی بین گونه‌ها یا بین جمعیت‌های درون یک گونه دارد. فاصله ژنتیکی معیاری از ارتباط ژنتیکی زیر جمعیت‌های یک جمعیت است. روش‌های برآورد فاصله ژنتیکی معیاری را برای اندازه‌گیری مقدار تغییر تکاملی بین دو جمعیت در زمانی که تفکیک شده‌اند، ارائه می دهند. فاصله ژنتیکی کمتر، نشان دهنده ارتباط ژنتیکی نزدیک تر و فاصله ژنتیکی بیشتر، نشان دهنده ارتباط ژنتیکی دورتر می باشد (تاکزاکی و نی[2]، ۱۹۹۶).

[1] Bataillon
[2] Takezaki and Nei

mtDNA ۷-۲-۱

عموما mtDNA ماهیان هوموپلاسمیک است به این مفهوم که تمامی مولکول‌های یک موجود با هم مشابه می‌باشند و از این رو می‌توان هر بافتی را به عنوان منبع DNA به کار برد. mtDNA هر سلول در چند نسخه وجود دارد و بنابراین جداسازی و تخلیص آن نسبتاً آسان است (برون، ۱۹۸۳). سه ویژگی mtDNA جانوری آن را به نشانگر ژنتیکی کارامدی برای بررسی های سیستماتیک مولکولی، ژنتیک جمعیت و بررسی روابط شجره‌ای گونه‌های خویشاوندِ نزدیک، مبدل کرده است. این ویژگی ها عبارتند از تعداد زیاد نسخه به ازای هر سلول (تقریباً ۱۰۰۰ نسخه و بیشتر)، اندازه کوچکتر آن از DNA ژنومی، وراثت پذیری مادری، هاپلوئید بودن و عدم وجود نوترکیبی در آن. همچنین از امتیاز دیگر DNA میتوکندریایی این است که سرعت جایگزینی نوکلئوتیدها در mtDNA مهره داران عالی تقریباً ۵ تا۱۰ برابر بیشتر از ژنوم هسته است. بنابراین mtDNA شامل تنوع بیشتری در توالی بازهای آلی است که در نتیجه تشخیص گونه‌های کاملاً وابسته را امکان پذیر می‌کند (نادری[1] و همکاران، ۲۰۰۷).

بررسی‌های mtDNA کاربردهایی را در زیست شناسی و مدیریت صید دارد که از جمله می توان به بررسی تغییرات درون و بین جمعیتی افراد در سطح گونه و جنس و همچنین مطالعات تاکسونومی و رده بندی اشاره نمود. مطالعات mtDNA می‌تواند در شناسایی ذخایر ماهیان نیز به کار رود و همچنین اطلاعاتی را برای بررسی دو رگه‌گیری و هم‌آمیزی ژنتیکی ماهیان فراهم آورده و به عنوان نشانگر ژنتیکی در حفاظت و احیای گونه‌های ماهیان مورد استفاده قرار گیرد. در برنامه های بازسازی ذخایر نیز که بر برنامه‌های رهاسازی استوارند، تنوع mtDNA برای ارزیابی بقا و رشد ماهیان رها سازی شده استفاده می شود و به کمک آن می توان ماهیان ساکن و ماهیان رهاسازی شده را تفکیک و شناسایی نمود (بلینگتون و هبرت[2]، ۱۹۹۱). متداول‌ترین نشانگرهای مولکولی که در سطح mtDNA استفاده می شوند شامل 16SrRNA، 12SrRNA، COI، ژن سیتوکروم b و ناحیه کنترلی (D-Loop) هستند. مطالعات نشان می‌دهد که ناحیه 16SrRNA دارای یک سرعت پایین تکاملی است بدین معنی که برای تفاوت‌های بین گونه‌ای بیشتر از درون گونه‌ای مفید است (گای و همکاران[3]، ۲۰۰۸). ژن 16SrRNA برای بررسی روابط فیلوژنتیک ماهیان در سطوح مختلف طبقه بندی استفاده شده است (کورتی[4] و همکاران، ۱۹۹۷) که عمدتاً به این دلیل است که این ژن بسیار حفاظت شده بوده و یک تکامل تدریجی و آهسته دارد. از دیگر علل انتخاب این ژن بالا بودن تعداد کپی این مولکول و پایداری آن در سلول است (پیج و هولمز[5]، ۱۹۹۸).

[1] Naderi
[2] Billington and Hebert
[3] Gai
[4] Corti
[5] Page and Holmes

امروزه کاربرد توالی یابی mtDNA در بررسی روابط شجره شناسی ماهیان از زمینه‌های تحقیقاتی مهم محسوب می‌شود. نوع توالی مورد استفاده به سطح شجره شناسی فرضیه مورد آزمون بستگی دارد، توالی های با سرعت تکامل متوسط (مانند سیتوکروم b) برای بررسی روابط بین جنس ها استفاده می شوند و برای مقایسه در سطح خانواده‌ها، ژن‌های دارای سرعت تکامل کند مانند ژن‌های 12S و 16S RNA ریبوزومی و COI را می‌توان استفاده نمود (استپین و کوهر[1]، ۱۹۹۷).

۱-۲-۸ استخراج DNA

نقطه شروع بسیاری از روشهای مولکولی جداسازی DNA با کیفیت عالی است. معمولاً کیفیت DNA با عواملی از قبیل عدم آلودگی ناشی از RNA، پروتئین، لپید و سایر ساختارهایی که برای آنزیمهای برشی و پلی‌مرازها مزاحمت ایجاد می‌کنند سنجیده می‌شود. پروتئین زدایی بیشتر از طریق پروتئیناز K صورت می‌گیرد که این ماده در بافر لیزکننده مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آنزیم در حضور SDS در دمای ۶۵-۵۶ درجه سانتیگراد فعالیت دارد. تحت این شرایط، پروتئین واسرشت می‌شود. برعکس در همین شرایط آنزیم های دیگر مثل DNAase دناتوره می‌شود. متعاقب استفاده از پروتئیناز K از ایزوپروپانول برای از بین بردن مؤثر پروتئین ها استفاده می شود. باقیمانده پروتئین و لیپید نیز به طور مؤثر از طریق کاربرد فنل و کلروفرم از بین می رود و آلودگی RNA نیز از طریق RNAase رفع خواهد شد. وجود EDTA به میزان حداقل دو میلی مول در بافر استخراج باعث می‌شود که کوآنزیم های آنزیم DNAase با EDTA شلات شود و از تجزیه تصادفی DNA جلوگیری نماید.

۱-۲-۹ واکنش زنجیره ای پلیمراز

تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR برای اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط کری مولیس ابداع شد. PCR مخفف Polymerase chain Reaction یا واکنش زنجیره ای پلیمراز است که علت این نامگذاری به علت الگو قرار گرفتن رشته های DNA جدید ساخته شده برای تولید زنجیره های DNA در سیکل های بعدی واکنش PCR می باشد. PCR یک روش آزمایشگاهی سریع و کارآمد برای تکثیر قطعه‌ای از یک مولکول DNA از کل ژنوم سلول می‌باشد. این روش معمولاً برای تکثیر قطعه DNA اختصاصی از بین یک مجموعه ناهمگن از توالی‌های متعدد DNA مانند تمام ژنوم سلول و یا یک مجموعه ای از توالی‌های DNA مکمل مورد استفاده قرار می‌گیرد. هم اکنون بیشتر نشانگرهای مولکولی از قبیل AFLP، SNP، SSL و.... بر پایه PCR هستند. در این تکنیک، یک مولکول DNA میلیونها بار تکثیر می‌شود. در روش PCR سیکل‌های دمایی ایجاد می‌شود. در ابتدا با ایجاد حرارت و رساندن دمای محلول به نقطه ذوب

[1] Stepien and Kocher