

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۱۷

ص ۳۲۹-۳۴۲

تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی سخت‌پوست *Paramysis*

intermedia در مناطق تیاب و خلیج گواتر با استفاده از

توالی‌یابی ژن میتوکندریایی 16S rRNA

- ❖ **سمیرا وحیدی‌نژاد:** دانشجوی کارشناسی ارشد-گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان
- ❖ **ایمان سوری‌نژاد*:** استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان
- ❖ **سعید تمدنی جهرمی:** استادیار بخش ژنتیک، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، هرمزگان
- ❖ **آرش اکبرزاده:** استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان
- ❖ **فریبا کشاورزی:** دانشجوی کارشناسی ارشد-گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان
- ❖ **فریدون چکمه‌دوز قاسمی:** کارشناس ارشد بخش ژنتیک و اصلاح نژاد، پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های داخلی، بندر انزلی

چکیده

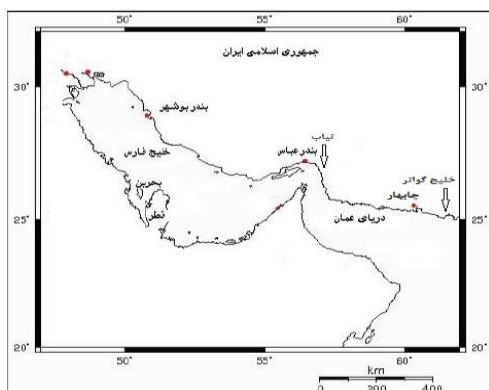
یکی از مهم‌ترین ژنوپلانکتون‌هایی که در نواحی مصبی و دریایی مورد تغذیهٔ آبزیان قرار می‌گیرد سخت‌پوست پارامایسیس اینترمیدیا *Paramysis intermedia* است. با توجه به وجود ذخایر این ژنوپلانکتون در خلیج فارس و دریای عمان، آگاهی از ساختار ژنتیکی آن به منظور حفظ تنوع زیستی و خزانهٔ ژنی دارای اهمیت است. در پژوهش حاضر برای اولین بار ساختار ژنتیکی و جمعیتی سخت‌پوست پارامایسیس اینترمیدیا در دو منطقهٔ تیاب و خلیج گواتر با استفاده از توالی‌یابی ژن 16S rRNA میتوکندریایی بررسی شد. نتایج ده نمونهٔ توالی‌یابی شده شامل ۳۶۵ باز هم‌ردیف‌شدهٔ ژن 16S rRNA، ۳۳۹ جایگاه ژنی مونومورف، ۲۶ جایگاه ژنی پلی‌مورف و ۲۷ موتاسیون نشان‌دهندهٔ نرخ بسیار کم موتاسیون در این گونه بین مناطق مورد مطالعه بود. هیچ گونه چندشکلی اضافه و حذف مشاهده نشد. تعداد نه هاپلوטיפ در دو منطقه به دست آمد و میزان تنوع هاپلوטיפی و تنوع نوکلئوتیدی برای تمامی نمونه‌ها بین دو منطقه به ترتیب 0.003 ± 0.000 و 0.035 ± 0.000 محاسبه شد. مقدار هتروزایگوسیتی مورد انتظار برای منطقهٔ تیاب بیشتر (0.184 ± 0.287) از خلیج گواتر (0.088 ± 0.14) بود. مقدار Fst در سطح احتمال 0.05 بین دو جمعیت 0.18 و معنی‌دار بود و در ترسیم درخت فیلوژنتیکی این جدایی به‌وضوح دیده شد. میانگین مقدار آزمون Tajima's D و Fu's FS بین دو منطقه به ترتیب -0.12 و $2/51$ و غیر معنی‌دار بود که نشان‌دهندهٔ نبود بسط جمعیتی بین نمونه‌های دو منطقه است. نتایج نشان داد که سخت‌پوست پارامایسیس اینترمیدیا در دو منطقهٔ مطالعه شده، به خصوص منطقهٔ تیاب، از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است و هر یک جمعیت مستقلی دارند.

واژگان کلیدی: پارامایسیس اینترمیدیا *Paramysis intermedia*، تعیین توالی، تیاب، خلیج گواتر، 16S rRNA.

۱. مقدمه

تغییرات شرایط اقلیمی و جغرافیایی طی سال‌های متمادی بر جمعیت‌های آبزیان اثر گذاشته و سبب تغییرات تنوع زیستی و ژنتیکی یا انقراض گونه‌ها شده است. تنوع ژنتیکی بالا در اکوسیستم‌های آبی برای حفظ سازگاری جمعیت‌ها در شرایط محیطی در حال تغییر ضروری محسوب می‌شود (Avise, 2000). بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی در بین جمعیت‌ها و نیز بین افراد داخل جمعیت برای تفکیک و شناسایی ذخایر ژنتیکی به منظور پیشبرد برنامه‌های مدیریت و حفاظت از گونه‌ها و جوامع اهمیت اساسی دارد (Diz and Presa, 2009). اعمال مدیریت صحیح بر ذخایر آبزیان و توسعه آبی‌پروری زمانی با موفقیت همراه خواهد بود که شناسایی ذخایر ژنتیکی گونه‌ها و جمعیت‌های بومی هر منطقه مطالعه شود (Thompson et al., 1997). در واقع، اولین مرحله مهم در تدوین استراتژی مدیریت ذخایر آبزیان در منابع آبی مشخص شدن ساختار ژنتیکی جمعیت‌های در حال بهره‌برداری است. این استراتژی در صورتی که بر پایه روش‌های دقیق و قوی مثل داده‌های مولکولی باشد می‌تواند علاوه بر حفظ تنوع زیستی، میزان برداشت و بهره‌برداری را به حد پایدار و حداکثر برساند (Thai et al., 2006). تنوع ژنتیکی از تفاوت در توالی نوکلئوتیدهای DNA در بین افراد حاصل می‌شود و می‌توان آن را با نشانگرهای ژنتیکی اندازه‌گیری کرد. میتوکندری منشأ مادری دارد و نوترکیبی در آن انجام نمی‌گیرد. بنابراین، این خاصیت باعث بروز اختلاف ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته شده است (Liu and Cordes, 2004; Valles-Jimenex et al., 2006; Calo-Mata et al., 2009). توالی‌یابی ژنوم میتوکندریایی (mtDNA sequencing) یکی از پرکاربردترین روش‌ها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی و فیلوژئوگرافی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم محسوب می‌شود (Bruford et al., 2003). در بین نشانگرهای میتوکندریایی، ژن 16S rRNA سرعت پایین تکاملی از خود نشان می‌دهد و بنابراین برای مطالعه تمایز بین گونه‌ها مفید است (Calo-Mata et al., 2009).

یکی از مهم‌ترین زئوپلانکتون‌هایی که در نواحی مصبی و دریایی مورد تغذیه آبزیان قرار می‌گیرد سخت‌پوست پارامایسیس ایترمدیا *Paramysis intermedia* است. این گونه در شاخه بندپایان، زیرشاخه سخت‌پوستان، رده سخت‌پوستان عالی و خانواده *Mysidae* قرار دارد. ارزش بالای مایسیدها در تغذیه لارو ماهیان دریایی در شرایط پرورشی بر مبنای سرشاربودن آن‌ها از اسیدهای چرب غیر اشباع است (Woods and Valentino, 2003). در حال حاضر، ۱۰۶۵ گونه مایسید شناسایی شده‌اند که در چهار خانواده و بیش از ۱۷۰ جنس تقسیم‌بندی می‌شوند (Deprez et al., 2004). ارزیابی ژنتیکی جمعیت‌های مایسید در حفاظت و ارزیابی ذخایر و تکثیر و پرورش این گونه غذای زنده کاربرد زیادی دارد. از جدیدترین مطالعات انجام‌شده در این خانواده می‌توان به بررسی الگوهای فیلوژئوگرافی جمعیت‌هایی از مایسید گونه *Mesopodopsis slabberi* در غرب اروپا به وسیله توالی‌یابی ژن‌های میتوکندریایی COI و 16S rRNA اشاره کرد (Remerie et al., 2006). همچنین، فیلوژئوگرافی گونه مایسید مصبی *Neomysis integer* در طول



شکل ۱. مناطق نمونه‌برداری از سخت‌پوست پارامایسیس اینترمدیا در خلیج فارس و دریای عمان

استخراج DNA با روش فنل کلروفرم (Taggart *et al.*, 1992) انجام شد. قبل از انجام PCR، کیفیت DNAهای استخراج‌شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد ارزیابی شد. به منظور تعیین تنوع ژنتیکی در سخت‌پوست پارامایسیس اینترمدیا از روش توالی‌یابی مستقیم ژن 16S rRNA استفاده شد. بدین منظور ژن 16S rRNA به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با بهره‌گیری از یک جفت آغازگر به شرح ذیل که پیش از این برای تکثیر ژن 16S rRNA در خانواده Mysidae استفاده شده بود تکثیر شد (Palumbi *et al.*, 1991).

(Forward, 16Sar5') 5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'

(Reverse, 16Sbr3') 5'-CCG GTY TGA ACT CAG ATC AYG T-3'

هر ویال از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک میکرولیتر DNA حدوداً ۱۰۰ نانوگرم، پنج میکرولیتر PCR Buffer (10 X)، دو میکرولیتر MgCl₂ (۵۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ ماکرومول) و ۰/۴ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA پلیمرز با غلظت

سواحل شمال شرقی اقیانوس اطلس از دریای بالتیک تا جنوب اسپانیا بررسی شد (Remerie *et al.*, 2009). در حال حاضر، اطلاعات مستندی درباره ساختار ژنتیکی و جمعیتی این غذای زنده باارزش در خلیج فارس و دریای عمان در دسترس نیست. آگاهی از ساختار ژنتیکی و جمعیتی مناطق مهم پراکنش پارامایسیس اینترمدیا در خلیج فارس و دریای عمان به منظور حفظ تنوع زیستی و خزانه ژنی حائز اهمیت خواهد بود. هدف از این تحقیق تعیین میزان تنوع ژنتیکی و جمعیتی پارامایسیس اینترمدیا با استفاده از توالی‌یابی ژن میتوکندریایی 16S rRNA بوده است و استفاده از اطلاعات حاصل از این تحقیق می‌تواند در بهبود و اجرای سیاست‌های مدیریتی علمی شیلاتی در بخش تولید و پرورش این گونه سودمند باشد.

۲. مواد و روش‌ها

تعداد ده نمونه از گونه پارامایسیس اینترمدیا در سال ۱۳۹۲ از دو منطقه مورد مطالعه (تیاب در استان هرمزگان و خلیج گواتر در استان سیستان و بلوچستان) جمع‌آوری شد (شکل ۱) و پس از تثبیت در الکل ۹۶ درجه، به آزمایشگاه ژنتیک پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان انتقال یافت. منطقه تیاب در ۳۰ کیلومتری جنوب غربی شهرستان میناب در استان هرمزگان با مختصات طول جغرافیایی ۵۶°۵۲' شرقی و عرض جغرافیایی ۲۷°۳۱' شمالی و خلیج گواتر در شرق شهرستان چابهار در استان سیستان و بلوچستان در محدوده عرض جغرافیایی ۲۱°۲۰' - ۲۱°۰۰' شمالی و طول ۶۱°۴۰' - ۶۱°۲۰' شرقی قرار دارد.

(Thompson *et al.*, 1997). شاخص‌های تنوع مولکولی نظیر تعداد هاپلوتیپ‌ها، مکان‌های چندشکلی، تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی به همراه واریانس بر اساس مدل Nei (1978)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (Expected heterozygosity)، و اگرایی ژنتیکی (Fst) که نشانه جدایی جمعیت‌ها است به صورت جفتی بین مناطق نمونه‌برداری با ۱۰۰۰ تکرار (Slatkin and Hudson, 1991) با استفاده از نرم‌افزار Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 1992) و نرم‌افزار DnaSp (Rozas *et al.*, 2003) محاسبه شد. گسترش و پراکنش جمعیتی با روش استفاده از آزمون‌های بی‌طرفی (neutrality tests) شامل دو آزمون Tajima's D (Tajima, 1989) و Fu's FS (Fu, 1997) با استفاده از نرم‌افزار Arlequin v.3.1 بررسی شد. درخت فیلوژنتیکی با روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار MEGA v.4 رسم شد (Kimura, 1980). از ماهی سفید دریای خزر *Rutilus frisii kutum* که از نظر رده‌بندی فاصله قابل قبولی با پارامایسیس ایترمدیا داشت به عنوان outgroup استفاده شد.

۵۰/μl (سیناژن، ایران) بود که با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر MJ research مدل PTC-100 انجام شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر ژن مذکور با تنظیم دمای الحاق و بهینه‌سازی برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر مطابق جدول ۱ صورت گرفت.

پنج میکرولیتر از محصول PCR تمامی نمونه‌ها به همراه مارکر مولکولی ۱۰۰ باز (Fermentas GmbH, Germany) در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز قرار گرفتند و بقیه آن‌ها پس از ارسال به بخش مولکولی شرکت ماکروژن، خالص‌سازی (Purify) و به‌منزله DNA الگو برای توالی‌یابی استفاده شدند. واکنش‌های توالی‌یابی DNA به همراه آغازگر forward با بسته BigDye kit (Applied Biosystems, USA) و به وسیله دستگاه DNA analyzer مدل XL3730 (Applied Biosystems, USA) انجام شد. پس از دریافت توالی‌ها، بازنگری توالی‌های مشابه با نرم‌افزار Chromas 2.23 انجام شد. به منظور شناسایی اختلاف میان توالی‌ها، نمونه‌های توالی‌یابی شده با نرم‌افزار Clustal W هم‌ردیف شدند

جدول ۱. برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن 16S rRNA

تعداد چرخه	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)	مراحل PCR
۱	۳ دقیقه	۹۵	واسرشته‌سازی اولیه
	۳۰ ثانیه	۹۵	واسرشته‌سازی
۳۰	۴۵ ثانیه	۴۸	الحاق
	۶۰ ثانیه	۷۲	بسط
۱	۵ دقیقه	۷۲	بسط نهایی

۳. نتایج

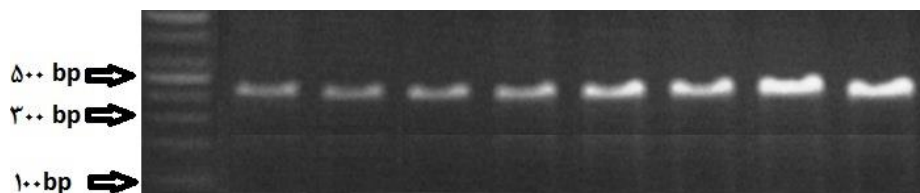
بهینه‌سازی واکنش PCR با استفاده از شیب دمایی ۶۰-۴۸ درجه سانتی‌گراد نشان داد که مناسب‌ترین دما برای اتصال آغازگر دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد است. آغازگرهای 16Sar5' و 16Sbr3' امکان تکثیر بخشی از ژن 16S rRNA به طول تقریبی ۴۸۰ جفت باز را فراهم کردند. الگوی بانندی محصول PCR روی ژل آگارز دو درصد در شکل ۲ نشان داده شده است.

بر اساس آنالیز انجام‌شده، تعداد نه هاپلوتیپ شناسایی شد. دو نمونه از نمونه‌های منطقه تیاب دارای هاپلوتیپ مشترک بودند (هاپلوتیپ شماره ۲)، ولی تمامی هاپلوتیپ‌های منطقه خلیج گواتر منحصر به فرد (Unique) بودند. بین نمونه‌های دو منطقه تیاب و خلیج گواتر هیچ هاپلوتیپ مشترکی به دست نیامد (جدول ۲).

از ۳۶۵ باز ردیف‌شده حاصل از ۱۰ نمونه

توالی‌یابی شده بین دو منطقه، ۳۳۹ جایگاه ژنی مونومورف، ۲۶ جایگاه ژنی پلی‌مورف و ۲۷ موتاسیون به دست آمد. هیچ گونه چندشکلی اضافه و حذف مشاهده نشد. میزان تنوع هاپلوتیپی یا ژنی برای هر دو منطقه بالا بود (۱/۰۰۰-۰/۹۰۰) به طوری که در تیاب به میزان $0/161 \pm 0/99$ و در خلیج گواتر به میزان $0/136 \pm 1/000$ ثبت شد.

همچنین، تنوع نوکلئوتیدی درون جمعیتی برای ژن مورد بررسی در تیاب به میزان $0/178 \pm 0/285$ و در خلیج گواتر به میزان $0/009 \pm 0/014$ ثبت شد. میزان تنوع هاپلوتیپی و تنوع نوکلئوتیدی برای تمامی نمونه‌ها (بین جمعیتی) به ترتیب $0/003 \pm 0/978$ و $0/000 \pm 0/035$ محاسبه شد (جدول ۲). میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای منطقه تیاب $0/184$ و برای خلیج گواتر $0/088 \pm 0/014$ محاسبه شد (جدول ۳).



شکل ۲. الگوی بانندی محصول PCR ژن 16S rRNA روی ژل آگارز ۲ درصد

جدول ۲. تعداد و پراکنش هاپلوتیپی ژن 16S rRNA پارامایسیس اینترمیدیا

هاپلوتايب	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	جمع
تیاب	۱	۲	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۵
گواتر	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۵
جمع	۱	۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱۰

جدول ۳. پارامترهای تنوع ژنتیکی پارامایسیس اینترمیدیا در دو منطقه تیاب و خلیج گواتر

پارامتر	تیاب	خلیج گواتر
تعداد نمونه‌های مورد بررسی	۵	۵
جایگاه‌های مورد بررسی	۳۶۵	۳۶۵
تعداد جایگاه‌های چندشکلی	۲۹۹	۱۱
چندشکلی اضافه و حذف	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
تعداد هاپلوتیپ	۴	۵
تنوع نوکلئوتیدی	۰/۲۸۵ ± ۰/۱۷۸	۰/۰۱۴ ± ۰/۰۰۹
تنوع هاپلوتیپی	۰/۹۹ ± ۰/۱۶۱	۱/۰۰۰ ± ۰/۱۳۶
هتروزایگوسیتی مورد انتظار	۰/۲۸۷ ± ۰/۱۸۴	۰/۰۱۴ ± ۰/۰۸۸

جدول ۴. ترکیب نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA در پارامایسیس اینترمیدیا در دو منطقه تیاب و خلیج گواتر (درصد)

منطقه	C	T	A	G	جمع
تیاب	۱۳/۷۵	۳۰/۴۱	۳۶/۸۰	۱۹/۰۵	۱۰۰
خلیج گواتر	۱۴/۳۷	۲۹/۹۸	۳۵/۲۷	۲۰/۳۸	۱۰۰

جدول ۵. نتایج آزمون‌های Fu's FS و Tajima's D در پارامایسیس اینترمیدیا در دو منطقه تیاب و خلیج گواتر

	Fu's FS		Tajima's D	
	FS	p value	D	p value
تیاب	۶/۰۹	۰/۹۸	- ۱/۲۲	۰/۰۰۷
خلیج گواتر	-۱/۰۶	۰/۱۵	۰/۹۸	۰/۸۰
میانگین	۲/۵۱	۰/۵۶	-۰/۱۲	۰/۴۰

ترکیب نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA در نمونه پارامایسیس برای هر دو منطقه تیاب و خلیج گواتر در جدول ۴ نشان داده شده است. مطالعه ترکیب نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA نشان داد که این توالی غنی از بازهای T و A (۶۶/۲۳ درصد) است.

بر اساس محاسبه فاکتور Fst بین نمونه‌های دو منطقه تیاب و خلیج گواتر، فاصله جمعیتی بین دو منطقه ۰/۱۸ به دست آمد که در سطح احتمال ۰/۰۵ نمونه‌های دو منطقه مورد مطالعه دارای اختلاف معنی دار بودند ($p < ۰/۰۵$, $p \text{ value} = ۰/۰۱$).

میانگین مقدار آزمون Fu's FS و Tajima's D برای ۱۰ توالی، به ترتیب -۰/۱۲ و ۲/۵۱ بین مناطق محاسبه شد. شاخص تاجیما منفی و شاخص Fu's FS مثبت بود ولی از لحاظ آماری هر دو شاخص معنی دار نبودند ($p > ۰/۰۱$) (جدول ۵).

در ترسیم درخت تکاملی به روش UPGMA به همراه یک outgroup متعلق به ماهی سفید دریای خزر سه کلاستر اصلی مشخص و مجزا به دست آمد به طوری که، نمونه‌های خلیج گواتر در یک کلاستر و نمونه‌های منطقه تیاب در دو کلاستر مختلف قرار گرفتند (شکل ۳).

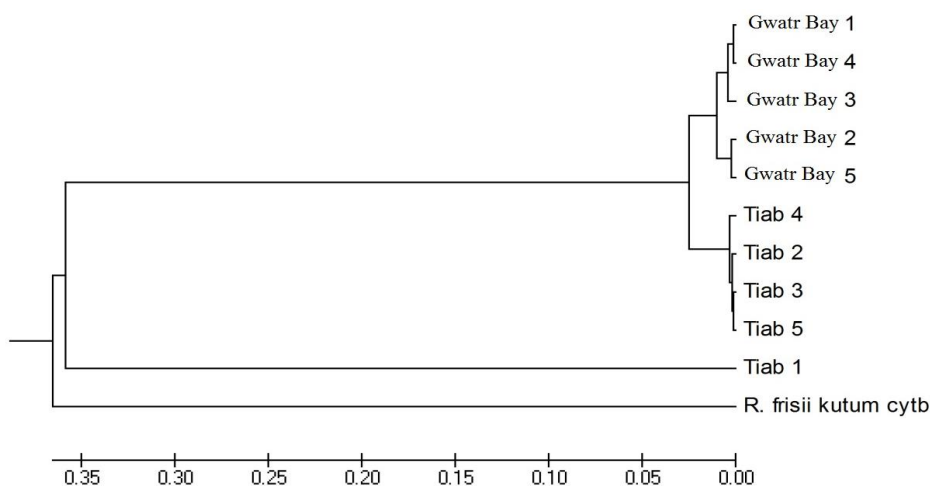
۴. بحث و نتیجه‌گیری

در دو دهه اخیر تحقیقات درباره ساختار جمعیتی گونه‌های مختلف آبزیان در بیشتر کشورهای جهان رایج شده و استفاده از نتایج آن‌ها سبب اعمال مدیریت علمی و صحیح به منظور ازدیاد ذخایر آبزیان و صنعت آبزی‌پروری شده است. اطلاع آگاهی از ساختار ژنتیکی و جمعیتی گونه‌های آبزیان و برخورداری از تکنیک‌های سریع و قابل اعتماد

پارامایسیس در منطقه تیاب در خلیج فارس بیشتر از منطقه خلیج گواتر در دریای عمان بود. همچنین، نتایج نشان داد که جمعیت‌های پارامایسیس منطقه تیاب و خلیج گواتر احتمالاً جمعیت‌های مجزایی را از نظر ژنتیکی تشکیل می‌دهند.

یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تفکیک بین جمعیت‌ها فاکتور *Fst* است که نشان‌دهنده تمایز یا جدایی بین جمعیت‌هایی است که در مناطق مختلف جغرافیایی زیست می‌کنند. در بررسی حاضر بر اساس آزمون *AMOVA* میزان *Fst* با اطمینان ۹۵٪ بین نمونه‌های دو منطقه ۰/۱۸ و معنی‌دار محاسبه شد ($p < ۰/۰۵$). بر طبق نظریه *Wright* (۱۹۷۸)، اگر *Fst* بین صفر تا ۰/۰۵ باشد نشان‌دهنده تمایز پایین، ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط، ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تمایز بالا و مقدار بالای ۰/۲۵ تمایز خیلی بالاست (*Wright*, ۱۹۷۸). بنابراین در بررسی حاضر، تمایز دو منطقه بالا بوده و پارامایسیس دو منطقه تیاب و خلیج گواتر را می‌توان در قالب دو جمعیت احتمالی مجزا بررسی کرد.

برای تعیین میزان خویشاوندی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای می‌تواند راهگشای بسیار خوبی برای استفاده مدیران اجرایی باشد، چراکه در بیشتر آبزیان و به ویژه در سخت‌پوستان، به رغم وجود صفات مورفولوژیکی یکسان، تفاوت‌های ژنتیکی در سطح وسیعی به اثبات رسیده است (*Palumbi et al.*, ۱۹۹۱). سخت‌پوست پارامایسیس اینترمدیا یکی از مهم‌ترین گونه‌ها در دو منطقه تیاب و خلیج گواتر است که بستر غذایی باارزشی برای آبزیان این مناطق محسوب می‌شود و با توجه به موارد بیان‌شده، در این بررسی ساختار ژنتیکی و جمعیتی این گونه سخت‌پوست در دریای عمان و خلیج فارس تعیین شد. نتایج تحقیق حاضر، که اولین بررسی درباره تنوع و ساختار ژنتیکی سخت‌پوست مهم پارامایسیس در سواحل جنوبی کشور است، نشان داد که تنوع هاپلوتیپی درون جمعیتی و بین جمعیتی بالایی در بین جمعیت‌های پارامایسیس در دو منطقه تیاب و خلیج گواتر در خلیج فارس و دریای عمان وجود دارد. میزان تنوع نوکلئوتیدی درون و بین جمعیتی



شکل ۳. درخت تکاملی و تفکیک جمعیتی UPGMA ژن 16S rRNA پارامایسیس اینترمدیا در دو منطقه تیاب و خلیج گواتر

جمعیت‌های دیگر شود (Remerie *et al.*, 2005; Remerie *et al.*, 2009).

یکی از مهم‌ترین عواملی که می‌تواند در ترکیب شدن یا نشدن جمعیت دو منطقه دخالت داشته باشد وجود سدهای فیزیکی یا گیاهی در مناطق مورد بررسی است. در این زمینه می‌توان به جنگل‌های حرا در هر دو منطقه اشاره داشت. جنگل‌های حرا یکی از مهم‌ترین مناطق نوزادگاهی و تغذیه لارو ماهی و میگو به حساب می‌آیند. در حقیقت پراکنش این جنگل‌ها در سواحل دو منطقه تیاب و گواتر و تمایل پارامایسیس به تخم‌ریزی در نزدیکی سواحل در این اکوسیستم‌ها از مهم‌ترین موانع در ایجاد اشتقاق ژنتیکی بین جمعیت‌های این گونه در این مناطق است. شرایط مطلوب زیست‌محیطی و سپری کردن چرخه کامل زندگی در خوریات و جنگل‌های حرا می‌تواند منجر به عدم مهاجرت افقی طولانی در گونه مورد بررسی شود که در تطابق با فاصله جغرافیایی زیاد و وجود جریان ژنی کم باعث تفریق جمعیتی این گونه در دو منطقه مورد مطالعه شده است.

اعداد D و F_s در صورت منفی و معنی دار بودن نشان از بسط و گسترش جمعیت‌ها دارند (این دو آزمون فرض را بر این قرار می‌گذارند که جمعیت‌ها در تعادل باشند). در این مطالعه، آزمون تاجیما منفی و آزمون F_u 's F_s مثبت بود، ولی هر دو شاخص از لحاظ آماری معنی دار نبودند. معنی دار نبودن این دو شاخص نشان‌دهنده نبود بسط و گسترده‌گی جمعیتی بین نمونه‌های دو منطقه به دلیل بعد مسافتی است.

تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، عاملی مهم و اساسی در تکامل و حفاظت بیولوژیکی آن‌هاست، زیرا سطوح

فاصله جغرافیایی زیاد بین جمعیت‌ها تأثیر مهمی در ساختار ژنتیکی و جریان ژنی دارد (Wang *et al.*, 2008). از آن‌جا که این دو منطقه تقریباً ۶۰۰ کیلومتر از هم فاصله دارند، احتمالاً از دلایل اصلی جدایی جمعیت پارامایسیس در دو منطقه تیاب و گواتر فاصله جغرافیایی زیاد این مناطق است. اصولاً اختلاف ژنتیکی بین جمعیت‌ها در نتیجه مجتمع شدن افراد در منطقه‌ای خاص به وجود می‌آید و جمعیت‌های یک گونه به واسطه آمیزش درونی با یکدیگر یک مخزن ژنی منحصر به همان جمعیت را ایجاد می‌کنند (Pinera *et al.*, 2007). با افزایش فاصله جغرافیایی فاصله ژنتیکی افزایش می‌یابد که علت آن کاهش جریان ژنی در اثر موانع فیزیکی یا طبیعی است (Beacham *et al.*, 2004). رفتار مهاجرت فاکتوری مهم و تأثیرگذار در میزان جریان ژنی است (Rudstam *et al.*, 1989). از آن‌جا که یکی از ویژگی‌های برجسته مایسیدها مهاجرت عمودی روزانه است و بیشتر از پنج مایل مهاجرت افقی ندارند (Ogonowski *et al.*, 2013) و فاقد لارو پلاژیک‌اند، تمایز بالای مشاهده شده بین مایسیدهای دو منطقه به علت کاهش جریان ژنی منطقی به نظر می‌رسد. فقدان مراحل پلانکتونی در مایسید می‌تواند به جمعیت‌هایی سازمان‌یافته یا مستقل از نظر ژنتیکی در مقایسه با گونه‌هایی با لارو پلاژیک و پراکنده‌گی بالا منجر شود (Weersing and Toonen, 2009). علاوه بر این مایسیدها رفتار schooling (جمعی) دارند و در این رفتار تمایل به درون‌آمیزی در هر جمعیت بیشتر است. در جمعیت‌هایی که به صورت گروهی زندگی می‌کنند و رفتار جمعی دارند هم‌ژنی جمعیتی در درازمدت می‌تواند باعث ایجاد تمایز با

جمعیت منجر می‌شود (Watterson, 1984; Bucklin and Wiebe, 1998). در سال ۲۰۰۹ نیز فیلوژئوگرافی گونه مایسید مصبی *Neomysis integer* در طول سواحل شمال شرقی اقیانوس اطلس از طریق توالی‌یابی ژن COI بررسی شد (Remerie et al., 2009). میانگین تنوع نوکلئوتیدی بین همه مناطق نمونه‌برداری ۰/۰۰۲۳۲۳ محاسبه شد. مقدار تنوع هاپلوטיפی نیز از ۰ تا ۰/۰۰۵۳۴ متغیر و دارای میانگین ۰/۳۶۶۲ بود. این مقدار تنوع ژنتیکی در مایسید مصبی *Neomysis integer* کمتر از مقادیر گزارش شده در *Mesopodopsis slabberi* (Remerie et al., 2009). تفاوت در نوع زیستگاه ترجیحی و تفاوت در میزان تحمل فیزیولوژیک نسبت به شرایط زیستی مختلف (مصبی و دریایی) می‌تواند در سطح تنوع ژنتیکی تأثیرگذار باشد (Remerie et al., 2006; Remerie et al., 2009). مایسید گونه *Mesopodopsis slabberi* قادر به زیست در نواحی مصبی، ساحلی و دریایی است بنابراین، افزایش زیستگاه ممکن است منجر به سطوح بالاتر تنوع ژنتیکی شود. وضعیت و شرایط فیزیولوژیک گونه *Paramysis intermedia* و مقاوم‌بودن به شرایط محیطی از جمله توانایی زیست در شوری‌های متفاوت (۴۰-۰) (Anahid et al., 2012)، که می‌تواند به افزایش زیستگاه‌ها منجر شود، از دلایل احتمالی دیگر اختلافات ژنتیکی و تمایز جمعیت‌های پارامایسیس در مناطق مختلف جغرافیایی از جمله در مناطق بررسی شده تحقیق حاضر است. علاوه بر این، پویایی تکاملی (موتاسیون، رانش ژنتیکی، انتخاب طبیعی) که در سطوح مختلف در موجود تأثیرگذارند نیز ممکن

بالای تنوع ژنتیکی توانایی جمعیت‌ها را در پاسخ به انتخاب طبیعی و بازماندگی افراد آن جمعیت افزایش می‌دهد. تعداد هاپلو تایپ‌های مختلف به دست آمده در دو منطقه مطالعه شده و اشتراک نداشتن آن‌ها همچنین، تنوع هاپلوטיפی و نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA برای این گونه بین نمونه‌های دو منطقه نشان از تنوع ژنتیکی قابل قبول جمعیت پارامایسیس ایترومدیا در دو منطقه دارد. در این مطالعه میزان تنوع هاپلوטיפی در داخل نمونه‌های هر منطقه و نیز بین دو منطقه در حد بالایی بود. از ده توالی بررسی شده، تعداد نه هاپلوטיפ منحصر به فرد شناسایی شدند. تراز تنوع هاپلوטיפی می‌تواند از صفر (همه افراد جمعیت دارای هاپلوטיפ یکسان) تا یک (همه افراد جمعیت دارای هاپلوטיפ‌های متفاوت) متغیر باشد.

در مطالعات انجام شده در سایر مناطق نیز می‌توان به بررسی الگوهای فیلوژئوگرافی بین جمعیتی مایسید گونه *Mesopodopsis slabberi* از طریق توالی‌یابی ژن COI و 16S rRNA میتوکندریایی از پنج جمعیت آتلانتیک و دو جمعیت مدیترانه غربی اشاره کرد (Remerie et al., 2006). در مجموع، سطح تنوع مولکولی درون جمعیتی بسیار بالایی برای همه نمونه‌ها محاسبه شد. بدین صورت که تنوع هاپلوטיפی ۰/۸۰۷ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۸۳ ثبت شد. این میزان تنوع هاپلوטיפی بالا برای گونه‌های دریایی غیر معمول نیست (Peijnenburg et al., 2004; Stamatis et al., 2004; Zardoya et al., 2004).

این تنوع بالا اغلب به بزرگ‌بودن اندازه جمعیت و پراکندگی گسترده در فواصل زیاد در گونه‌های دریایی نسبت داده می‌شود که به نگهداری بسیاری از هاپلوטיפ‌های منحصر به فرد در طول رشد و پراکنش

کم عمق در منطقه است که زیستگاه مناسبی را برای تخم‌ریزی و پرورش مراحل نوزادی آبزیانی از گونه‌های سخت‌پوستان و ماهیان فراهم آورده است. از سوی دیگر، خورهای متعدد از جمله خورهای کرگل، خورچاخا، خور بندزرک، خور نوبر و خور کلاهی در منطقه بندر کلاهی سبب شده است که سخت‌پوست پارامایسیس چرخه حیاتی خود را به خوبی طی کند و در این خورها مراحل رشد اولیه و پرورش خود را بگذراند و در نتیجه در منطقه تیاب ذخیره مایسید بهتری نسبت به خلیج گواتر فراهم شود. هر چه تکثیر طبیعی در منطقه بیشتر باشد، تنوع ژنتیکی و هتروزیگوسیتی نیز بیشتر خواهد بود. علاوه بر موارد ذکر شده، منطقه تیاب در دهانه رودخانه‌های شور، جلابی، حسن لنگی، تیاب، میناب و زرانی قرار دارد که در نتیجه ورود آب شیرین این چند رودخانه به خلیج فارس باعث پایین آمدن شوری، غنای غذایی منطقه و در نتیجه تنوع بیشتر زیستگاه می‌شود که تنوع بالاتر ژنتیکی را به دنبال دارد. در مقابل، خلیج گواتر با وجود هم‌جواری با رودخانه باهوکلالت و چند خور محلی اما به دلیل وجود خصوصیات فیزیکی و شیمیایی متغیر خود به منزله محل ته‌نشست یا منبع فلزات سنگین در محیط‌های ساحلی محسوب می‌شود (Harbison, 1986; Harris and Santos, 2000). زیست‌بوم جنگل حرا که در اطراف خور گواتر وجود دارد نیز به دلیل خصوصیات رسوب‌شناسی بستر و میزان زیاد مواد آلی محل تجمع آلاینده‌ها و فلزات سنگین در خلیج گواتر است. همچنین، گزارش شده است که در مقابل مصب کانال خروجی سایت‌های پرورش میگوی گواتر غلظت فلزات سنگین بیش از حد مجاز آن‌ها

است باعث بروز الگوهای متفاوت تنوع ژنتیکی شوند (Remerie et al., 2009).

در خورها و مصب‌ها، نوسانات فصلی شوری، کدورت، درجه حرارت و دیگر متغیرهای زیست‌محیطی همچنین جدایی این زیستگاه باعث شکل‌گیری ساختار ژنتیکی قوی و تمایز ژنتیکی گونه‌های این مناطق می‌شوند (Remerie et al., 2009). در نتیجه تأثیرات فرایندهای ریز تکاملی^۱ مثل جریان ژنی، رانش و انتخاب در این گونه مناطق افزایش می‌یابد (Bilton et al., 2002; Virgilio and Abbiati, 2004). این مسئله به خصوص زمانی شدت می‌یابد که مشخص شده است اندازه جمعیت مؤثر ژنتیکی^۲ در برخی گونه‌های مایسید مطالعه شده نسبت به اندازه کل جمعیت^۳ کم است (Remerie et al., 2005). در چنین شرایطی تنوع ژنتیکی ممکن است با میزان بالاتری در هر نسل از طریق پدیده رانش ژنتیکی^۴ کاهش یابد. چنین وضعیتی در تحقیق حاضر نیز با توجه به نتایج تمایز جمعیت‌های پارامایسیس در دو خور مطالعه شده همچنین تنوع نوکلئوتیدی پایین تأیید شد.

تنوع نوکلئوتیدی و هتروزیگوسیتی نمونه‌های پارامایسیس در منطقه تیاب بسیار بیشتر از خلیج گواتر بود و این مسئله در برنامه‌های بازسازی ذخایر و مدیریت شیلاتی این گونه می‌تواند مدنظر قرار گیرد. منطقه تیاب در حدود ۷۰ کیلومتری شرق بندرعباس در ساحل شمالی تنگه هرمز قرار دارد. این منطقه دارای اکوسیستم جنگل‌های حرا و سواحل

1. microevolutionary

2. genetic effective population size

3. census population size

4. genetic drift

نتایج گزارش شده حاصل اولین تحقیق درباره تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی سخت‌پوستی از خانواده مایسیدها در خلیج فارس و دریای عمان است. مطالعات بیشتری در آینده با استفاده از سایر ژن‌های میتوکندریایی و تطابق داده‌ها با سایر روش‌های شناسایی و ارزیابی جمعیتی مثل ویژگی‌های ریخت‌شناسی مورد نیاز خواهد بود تا همه گونه‌های این خانواده با اطمینان بالا شناسایی شوند و ساختار جمعیتی و ژنتیکی آن‌ها ارزیابی شود.

تشکر و قدردانی

از آقای مهندس زادعباس کارشناس ارشد بخش ژنتیک دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار به دلیل کمک در جمع‌آوری نمونه‌های منطقه گواتر و آقای مهندس صادقی کارشناس بخش اکولوژی پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان به دلیل همکاری در آنالیزهای آزمایشگاهی کمال تشکر به عمل می‌آید.

بوده است (Hamzeh et al., 2011). کم‌تر بودن تنوع میتوکندریایی در گونه‌ای مشخص در نواحی مختلف جغرافیایی ممکن است به علت شدت انتخاب طبیعی و از بین رفتن جمعیت و ظهور دوباره آن به دلیل تغییرات محیطی با منشأ طبیعی و انسانی نیز باشد (Cognetti and Maltagliati, 2004; Stamatis et al., 2009; Remerie et al., 2004). میزان بالای آلایندگی‌های طبیعی و آلایندگی‌های ایجادشده انسان از قبیل فعالیت‌های صید و صیادی، مواد شیمیایی سمی مثل آفت‌کش‌های ارگانوفسفره و فلزات سنگین حاصل از پساب صنایع در رسوبات ساحلی تأثیرات منفی فراوانی در جانداران کفزی و آبزیان دارد و می‌تواند باعث تخریب زیستگاه‌های طبیعی و احتمالاً باعث کاهش سطح تنوع ژنتیکی شود (Sole et al., 2000; Defew et al., 2005; Remerie et al., 2009). این مسئله می‌تواند از دلایل دیگر کاهش تنوع ژنتیکی سخت‌پوست پارامایسیس در منطقه خلیج گواتر باشد.

References

- [1]. Anahid, T., Sajjadi, M.M., Kamrani, E., Nazari Bajgan, A., 2012. Nutritional value investigation of Mysids from shrimp culture ponds of Hormozgan province and the effect of some environmental factors on their survival. M.Sc. thesis of Fisheries, Hormozgan University, 63p (In Persian).
- [2]. Avise, J.C., 2000. Phylogeography the history and formation of species. Harward University Press, Cambridge, 447p.
- [3]. Beacham, T.D., Mcintosh, M., MacConnachie, C., 2004. Population structure of lake-type and river-type sockeye salmon in Transboundary rivers of northern British Columbia. Journal of Fish Biology 65, 389-402.
- [4]. Bilton, D.T., Paula, J., Bishop, J.D.D., 2002. Dispersal, genetic differentiation and speciation in estuarine organisms. Estuarine, Coastal and Shelf Science 55, 937-952.
- [5]. Bruford, M., Bradley, D., Luikart, G., 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nature Reviews Genetics 3, 900-910.
- [6]. Bucklin, A., Wiebe, P.H., 1998. Low mitochondrial diversity and small effective population sizes on the copepods *Calanus finmarchicus* and *Nannocalanus minor*: possible impact of climate variation during recent glaciation. Journal of heredity 89, 383-392.
- [7]. Calo-Mata, P., 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. Analytical Biochemistry 391(2), 127-134.
- [8]. Cognetti, G., Maltagliati, F., 2004. Strategies of genetic biodiversity conservation in the marine environment. Marine Pollution Bulletin 48, 811-812.
- [9]. Defew, L.H., Mair, J.M., Guzman, H.M., 2005. An assessment of metal contamination in mangrove sediments and leaves from Punta Mala Bay, Pacific Panama. Marine Pollution Bulletin 50, 547-552.
- [10]. Deprez, T., Vanden Berghe, E., Vincx, M., 2004. NeMys: a multidisciplinary biological information system. In: VandenBerghe, E., Brown, M., Costello, M., Heip, C., Levitus, S., Pissierssens, P. (Eds). Proceedings of "The colour of ocean data": international symposium on oceanographic data and information management with special attention to biological data. Brussels, Belgium. IOC Workshop Report (UNESCO, Paris), 188, 57-63.
- [11]. Diz, P.A., Presa, P., 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galicia Rías (NW Iberian estuaries). Aquaculture 287, 278-285.
- [12]. Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131, 479-49.
- [13]. Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147, 915-925.
- [14]. Hamzeh, M.A., Boumeri, M., Rezaei, H., Baskaleh, G.R., 2011. Environmental geochemistry of heavy metals in coastal sediments of Gwatr bay, southeastern Iran. Oceanography 2(8), 11-20 (In Persian).

- [15]. Harbison, P., 1986. Mangrove muds: a sink or source for trace metals. *Marine Pollution Bulletin* 17, 246-250.
- [16]. Harris, R.R., Santos, M.C.F., 2000. Heavy metal contamination and physiological variability in the Brazilian mangrove crabs, *Ucides cordatus* and *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda). *Marine Biology* 137, 691-703.
- [17]. 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.
- [18]. Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004. DNA marker technological and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 38, 1-37.
- [19]. Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and Genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.
- [20]. Ogonowski, M., Hansson, S., Duberg, J., 2013. Status and vertical size distributions of a pelagic mysid community in the northern Baltic proper. *Boreal Environment research* 18, 1-8.
- [21]. Palumbi, S., Martin, R.A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L., Grabowski, G., 1991. The simple fool's Guide to PCR, Version 2. University of Hawaii Zoology Department, Honolulu, 94p.
- [22]. Peijnenburg, K.T.C., Breeuwer, J.A.J., Pierrot-Bults, A.C., Menken, S.B.J., 2004. Phylogeography of the planktonic chaetogenath *Sagitta setosa* reveals isolation in European seas. *Evolution* 58, 1472-1487.
- [23]. Pinera, J.A., Blanco, G., Vázquez, E., Sánchez, J.A., 2007. Genetic diversity of black spot seabream (*Pagellus bogaraveo*) populations Spanish Coasts: a preliminary study. *Marine Biology* 151, 2153-2158.
- [24]. Remerie, T., Bourgois, T., Peelaers, D., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Vanreusel, A., 2006. Phylogeographic patterns of the mysid *Mesopodopsis slabberi* (Crustacea, Mysida) in Western Europe: evidence for high molecular diversity and cryptic speciation. *Marine Biology* 149, 465-481.
- [25]. Remerie, T., Bourgois, T., Vanreusel, A., 2005. Morphological differentiation between geographically separated populations of *Neomysis integer* and *Mesopodopsis slabberi* (Crustacea, Mysida). *Hydrobiologia* 549, 239-250.
- [26]. Remerie, T., Vierstraete, A., Weekers, P.H.H., Vanfleteren, J.R., Vanreusel, A., 2009. Phylogeography of an estuarine mysid, *Neomysis integer* (Crustacea, Mysida), along the north-east Atlantic coasts. *Journal of Biogeography* 36, 39-54.
- [27]. Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by thecoalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496-2497.
- [28]. Rudstam, L.G., Danielsson, K., Hansson, S., Johansson, S., 1989. Diel vertical migration and feeding Patterns of *Mysis mixta* (crustacean, mysidacea) in the Baltic Sea. *Marine Biology* 101, 43-520.
- [29]. Slatkin, M., Hudson, R., 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129, 555-562.
- [30]. Sole, M., Porte, C., Barcelo, D., Albaiges, J., 2000. Bivalves residue analysis for the assessment of coastal pollution in the Ebro Delta (NW Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin* 40, 746-753.
- [31]. Stamatis, C., Triantafyllidis, A., Moutou, K.A., Mamuris, Z., 2004. Mitochondrial DNA variation in Northeast Atlantic and Mediterranean populations of Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Molecular Ecology* 13, 1377-1390.

- [32]. Taggart, J.B., Hynes, R.A., Prodohal, P.A., Ferguson, A., 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of fish biology* 40, 963-965.
- [33]. Tajima, F., 1989. Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- [34]. Thai, B.T., Pham, T.A., 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.
- [35]. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL-X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research* 2, 4876-4882.
- [36]. Valles-Jimenex, R., 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.
- [37]. Virgilio, M., Abbiati, M., 2004. Habitat discontinuity and genetic structure in populations of the estuarine species *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 61, 361-367.
- [38]. Wang, H., Kesinger, J.W., Zhou, Q., Matrin, G., Turner, S., 2008. Identification and characterization of zebra fish ocular formation genes. *Genome* 51(3), 222-235.
- [39]. Watterson, G.A., 1984. Lines of descent and the coalescent. *Theoretical Population Biology* 26, 77-93.
- [40]. Weersing, K., Toonen, R.J., 2009. Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series* 393, 1-12.
- [41]. Woods, M.C., Valentino, F., 2003. Frozen mysids as an alternative to live *Artemia* in culturing seahorses *Hippocampus abdominalis*. *Aquaculture Research* 34, 757-763.
- [42]. Wright, S., 1978. *Evolution and the genetics of populations variability within and among natural populations*. University of Chicago Press. 2nd Ed., University of Chicago Press, Chicago, 465p.
- [43]. Zardoya, R., Castilho, R., Grande, C., Favre-Krey, L., Caetano, S., Marcato, S., Krey, G., Patarnello, T., 2004. Differential population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and the chub mackerel (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology* 13, 1785-1798.