بررسی میزان شاخص ژنتیکی مولدین میگوهای سفید غربی وارداتی مراکز تکثیر استان بوشهر

محمد خلیل پذیر[1]، عباسعلی زنده‌بودی[1]، صغری اشرف[2]، علی قوامپور[1]، اسماعیل عاشوری[2]، ناصر میرشکاری، ماندانا شمسی‌زاده[2]

dr.pazir@gmail.com

1- پژوهشکده میگوی کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بوشهر، ایران.

2- اداره کل شیلات استان بوشهر

چکیده:

هدف از انجام این مطالعه بررسی میزان شاخص‌های ژنتیکی مولدین میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) وارداتی و پرورشی مراکز تکثیر استان بوشهر بمنظور پیشگیری از افزایش ضریب هم‌خونی در نتاج حاصله از آنها بود. به دلیل عدم صدور مجوز جمع آوری پیش مولد از مزارع پرورش میگو در سال 94 مراکز تکثیر بخش خصوصی طی دو سال متوالی اقدام به وارادات مولد نمودند، از این رو بر اساس بررسی‌های صورت گرفته ذخیره مولدین کشور در طی سال‌های 95 و 96 شامل مولدین وارداتی از کمپانی مولوکائی هاوایی (F0-95, F0-96) و نتاج پرورش یافته حاصل از مولدین وارداتی سال 95 (F1-9`6) بود. پس از نمونه‌گیری بافت عضلانی و استخراج ماده ژنتیکی آنها، تکثیر توالی‌های تکرار شونده بر روی ژنوم با استفاده از پرایمرهای میکروساتلایت و دستگاه ترموسایکلر صورت پذیرفت. در ادامه پس از انتقال محصول PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید شاخص‌های ژنتیکی مولدین نسل‌های مختلف شامل فراوانی آلل های مؤثر و واقعی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و ضریب هم خونی تعیین شد. نتایج حاکی از آن بود که حاکی از آن بود که میانگین فراوانی آلل های واقعی و تنوع ژنتیکی در نتاج پرورشی حاصل از مولدین وارداتی (F1-96) بطور معنی داری بیشتر از مولدین وارداتی بود. همچنین بیشترین میزان ضریب هم خونی در مولدین وارداتی 96 (F0-96) محاسبه شد این در حالی بود که در میزان این شاخص در مولدین پرورشی 96 (F1-96) و وارداتی 95 (F0-95) هیچگونه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: میگوی سفید غربی، تنوع ژنتیکی، آلل، ضریب هم‌خونی

1-مقدمه:

زیستگاه اصلی میگوی سفید غربی سواحل اقیانوس آرام از جنوب مکزیک تا شمال کلمبیا می باشد(Perez Farfante & Kensley 1997)، لیکن بومی سازی این گونه برای اولین بار در زیستگاه طبیعی (آمریکای مرکزی و جنوبی) آن صورت گرفت (Gitterle et al., 2005). این گونه اولین بار در سال 1988 به آسیا معرفی و جایگزین میگوی ببری سیاه که گونه بومی منطقه بود شد (Rosenberry, 2006). به دنبال این رویداد مؤسسه تحقیقات شیلات ایران در سال 2004 (1383 شمسی) برای اولین بار بمنظور ایجاد تنوع گونه ای و مقابله با مشکلات ایجاد شده ناشی از بیماری لکه سفید، این گونه را جایگزین میگوی پرورشی سفید هندی نمود. متأسفانه در سال های گذشته مشاهده شده بود که در پی آمیزش های بدون برنامه صورت گرفته (De Donato *et al.*, 2005) میان مولدین نر و ماده جمعیت های مختلف میگوی سفید غربی یک آرایش نامناسب از کروموزوم ها در نسل های بدست آمده ایجاد شود، به گونه ای که این امر امروزه با افزایش طول دوره پرورش، کاهش شدید میزان بازماندگی لاروهای حاصل از مولدین مراکز تکثیر همراه شده بود. شاید بتوان گفت که این حالت ناشی از افزایش آمیزش های خویشاوندی و بدون برنامه صورت گرفته میان مولدین میگوی سفید غربی و افزایش میزان ضریب هم خونی در لاروهای حاصل از آنها باشد. در این رابطه عنوان شده که کاهش تنوع ژنتیکی ایجاد شده در میگوهای سفید غربی کشور برزیل می تواند ناشی از تکثیر های درون گروهی و افزایش ضریب همخونی باشد که در نتیجه آن میزان رشد، بازماندگی، تولید مثل (Gjedrem, 2005) و توانایی در سازش آنها با تغییرات محیطی می تواند با کاهش همراه شده بود، به گونه ای که یک رابطه منفی معنی داری میان کاهش تنوع ژنتیکی و میزان تولید مثل مشاهده شده بود (Sbordoni *et al.*, 1986). دیگر مطالعات انجام شده مشخص کردند که اثرات تکثیر درون گروهی برروی جمعیت های میگوی سفید

غربی می تواند موجب کاهش میزان رشد و بازماندگی میگوها گردد، لذا می بایست تا حد امکان از تکثیرهای درون گروهی در میان افراد یک خانواده (10 ٪>) در برنامه های تکثیر میگو بویژه زمانیکه میگوها تحت شرایط استرس زا پرورش و نگهداری می شوند جلوگیری به عمل آورد (Moss *et al.*, 2007). از این رو مطالعه بر روی ویژگی های ژنتیکی جمعیت‌های مختلف یک گونه از میگو و تجزیه و تحلیل ارتباطات ژنتیکی بین مولدین می تواند ابزار مناسبی برای مدیریت شناسایی ژنتیکی و افتراق های ژنتیکی در برنامه های پرورشی باشد. با توجه به شیوع بیماری لکه سفید در مزارع پرورش میگوی استان بوشهر در سال 94 و عدم صدور مجوز برای جمع آوری پیش مولد از مزارع پرورشی، مراکز تکثیر استان در طی سال‌های 95 و 96 اقدام به واردات مولد میگوی سفید غربی به داخل کشور نمودند. لذا در این مطالعه سعی شد بر اساس یک برنامه منظم شاخص‌های ژنتیکی مولدین وارداتی و نتاج حاصل از آنها جهت تعیین میزان فراوانی آلل‌ها و میزان تنوع ژنتیکی در نسل‌های مختلف بمنظور پیشگیری از افزایش ضریب هم‌خونی در نتاج حاصله مورد بررسی قرار گیرد.

2-مواد و روش:

بررسی‌های صورت گرفته در استان بوشهر حاکی از فعالیت 14 مرکز تکثیر بخش خصوصی در استان می‌باشد. با توجه به شیوع بیماری ویروسی لکه سفید در سال 94 مهمترین منبع تأمین مولدین در سال 95 مولدین وارداتی از کمپانی مولوکائی هاوایی (F0-95)، و در سال 96 علاوه بر واردات مولدین جدید از کمپانی مولوکائی هاوایی (F0-96) از نتاج پرورش یافته حاصل از مولدین سال قبل (F1-96) نیز استفاده شد.

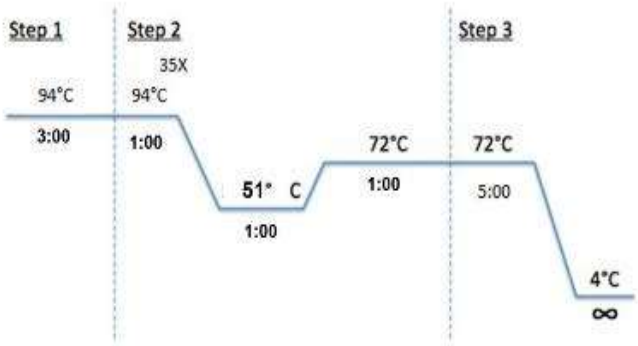
بر این اساس نمونه‌گیری از بافت عضلانی پای شنای مولدین نسل‌های مختلف انجام شد. بدین طریق نمونه‌های جمع آوری شده تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در الکل 96 درجه در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شدند (شکل 1). در این مطالعه بمنظور استخراج ماده ژنتیکی DNA از روش CTAB استفاده شد (Valles-Jimenez *et al.*, 2004).

شکل 1: نمونه‌گیری از بافت عضلانی مولدین وارداتی و پرورشی مراکز تکثیر استان بوشهر

بعد از تعیین کمیت و کیفیت مواد ژنتیکی استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز افقی تکثیر توالی‌های تکراری DNA های نمونه‌های استخراج شده از طریق تکنیک PCR با استفاده از 8 جفت آغازگر اختصاصی پلی مورفیک میگوی سفید غربی صورت پذیرفت (شکل 2) (Cruz *et al.*, 2004; Freitas *et al.*, 2007).

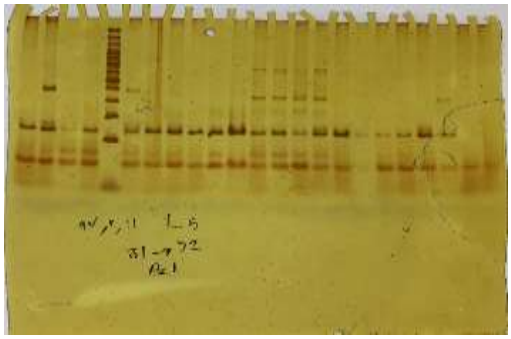
شکل 2: تعیین کمیت و کیفیت مواد ژنتیکی استخراج شده از مولدین وارداتی و پرورشی

در این مطالعه از دستگاه ترموسایکلر مدل Corrbet جهت تکثیر توالی‌های تکرار شونده DNA استفاده شد. تکثیر جایگاه‌ها توسط دستگاه ترموسایکلر از سه مرحله تشکیل شده بود، بدین صورت بود که مرحله اول شامل واسرشت شدن اولیه در درجه حرارت 94 درجه سانتیگراد به مدت 3 دقیقه برای یک چرخه، مرحله دوم شامل واسرشت شدن در 94 درجه سانتیگراد، اتصال به قطعه هدف در درجه حرارت 51 درجه سانتیگراد و بسط شدن در درجه حرارت 72 درجه سانتیگراد هر کدام به مدت 30 ثانیه برای 30 چرخه تنظیم گردید. در انتها بسط نهایی در درجه حرارت 72 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه در یک چرخه صورت پذیرفت (شکل 3).



شکل 3: برنامه دمایی اجرا شده در دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر توالی‌های تکرار شونده

در ادامه 5 میکرولیتر محصول PCR به درون چاهک‌های ایجاد شده بر روی ژل پلی آکریل آمید 8 درصد همراه با نشانگر استاندارد[1] 100-3000 bp تزریق شد. تجزیه و تحلیل شاخص‌های ژنتیکی مولدین نسل‌های مختلف شامل فراوانی آلل های مؤثر و واقعی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و ضریب هم خونی در جایگاه‌های میکروستلایت با استفاده از نرم افزار Gene Alex انجام شد (شکل 4) (Peakall & Smouse, 2006).



شکل 4: باندهای تشکیل شده بر روی ژل آکریل آمید

3-نتایج و بحث:

[1] -Marker

نتایج حاکی از آن بود که میانگین فراوانی آلل های واقعی در نتاج پرورشی حاصل از مولدین وارداتی در سال 96 (F1-96) بطور معنی‌داری بیشتر از مولدین وارداتی سال 95 (F0-95) بود ($P<0.05$). از سوی دیگر علیرغم بیشتر بودن فراوانی آلل‌های واقعی در نتاج پرورشی (مولدین F1-96) نسبت به مولدین وارداتی سال 96 (F0-96) هیچگونه اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($P>0.05$). همچنین بررسی های بعمل آمده حاکی از عدم مشاهده آلل اختصاصی در ذخیره‌های بررسی شده بود (جدول 1).

جدول 1: مقادیر فراوانی آلل‌های واقعی و موثر در مولدین وارداتی و پرورشی مراکز تکثیر استان بوشهر

ذخیره	فراوانی آلل واقعی	فراوانی آلل مؤثره
F0-95	3/0±571/297[b]	2/0±292/159[c]
F1-96	3/0±857/340[a]	2/0±768/267[a]
F0-96	3/0±714/286[b]	2/0±654/276[b]

با توجه به نتایج بدست آمده مشاهده شد که میزان تنوع ژنتیکی در مولدین پرورشی سال 96 F1-96 بطور معنی‌داری بیشتر از تنوع ژنتیکی بدست آمده در مولدین وارداتی سال 95 و 96 بود ($P<0.05$). همچنین میزان تنوع ژنتیکی مولدین وارداتی 96 بطور معنی‌داری کمتر از مولدین وارداتی 95 بود ($P<0.05$) (جدول 2).

جدول 2: مقادیر تنوع ژنتیکی مشاهده شده و قابل انتظار در مولدین وارداتی و پرورشی مراکز تکثیر استان بوشهر

ذخیره	**تنوع ژنتیکی مشاهده شده**	**تنوع ژنتیکی قابل انتظار**
F0-95	0/0±409/092[b]	0/0±552/029[b]
F1-96	0/0±419/094[a]	0/0±620/034[a]
F0-96	0/0±332/065[c]	0/0±599/039[b]

بررسی میزان هم خونی در مولدین وارداتی و پرورشی مراکز تکثیر نشاندهنده وجود بیشترین میزان ضریب هم خونی در مولدین وارداتی 96 (F0-96) بود، به گونه‌ای که این میزان بطور معنی داری بیشتر از مقادیر موجود در مولدین پرورشی 96 (F1-96) و وارداتی 95 (F0-95) محاسبه شد (جدول 3).

جدول 3: مقادیر ضریب هم‌خونی در مولدین وارداتی و پرورشی مراکز تکثیر استان بوشهر

ذخیره	**میزان ضریب هم خونی**
F0-95	0/0±266/150[b]
F1-96	0/0±288/174[b]
F0-96	0/0±424/128[a]

با توجه به نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر همانگونه که مشاهده می‌شود بیشترین میزان فراوانی آلل و بیشترین میزان تنوع ژنیتکی در نتاج پرورشی حاصل از مولدین وارداتی 95 (F1-96) حاصل شده بود. در این رابطه می‌توان اینگونه عنوان نمود که با توجه به تکثیر مولدین وارداتی نسل صفر 95 در کشور و استفاده از نتاج پرورشی آنها به عنوان مولدین نسل دوم در سال 96 از یک سو هم افراد بیشتری برای مولد سازی انتخاب شدند هم اینکه به دلیل افزایش تعداد افراد جمعیت بنیادی در نسل اول سال 96 شانس ظهور آلل‌ها به دلیل مشارکت بیشتر افراد در آمیزش نسبت به مولدین وارداتی که تعداد افراد کمتری در آمیزش مشارکت کرده بودند افزایش یافت. این موضوع نیز در رابطه با افزایش تنوع ژنتیکی و میزان ضریب هم خونی در مولدین پرورشی نسل اول سال 96 نیز می‌تواند صدق کند.

4-منابع:

1- Cruz, P., Ibarra, A.M., Mejia-Ruiz, H., Gaffney, P.M., Pérez-Enríquez, R., 2004. Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei). Marine Biotechnology 6, 157-164.

2- De Donato, M., Manrique, R., Ramirez, R., Mayer, L., Howell, C., 2005. Mass selection and inbreeding effects on a cultivated strain of Penaeus (Litopenaeus) vannamei in Venezuela. Aquaculture 247, 159-167.

3- Freitas, P.D., Jesus, C.M., GALETTI, P.M., 2007. Isolation and characterization of new microsatellite loci in the Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei and cross-species amplification in other penaeid species. Molecular Ecology Notes 7, 324-326.

4- Gitterle, T., Rye, M., Salte, R., Cock, J., Johansen, H., Lozano, C., Suárez, J.A., Gjerde, B., 2005. Genetic (co) variation in harvest body weight and survival in Penaeus (Litopenaeus) vannamei under standard commercial conditions. Aquaculture 243, 83-92.

5- Gjedrem, T. 2005. Selection and Breeding Programs in Aquaculture. Springer, Dordrecht, 364 pp.

6- Moss, D. R., Arce, S.M., Otoshi, C. A., Doyle, R.W. and Moss, Sh. M. 2007. Effects of inbreeding on survival and growth of Pacific white shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*. Aquaculture 272S1, S30–S37.

7- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6, 288-295.

8- Perez-Enriquez, R., Hernández-Martínez, F., Cruz, P., 2009. Genetic diversity status of White shrimp Penaeus (Litopenaeus) vannamei broodstock in Mexico. Aquaculture 297, 44-50.

9- Rosenberry, B., 1996. Shrimp news international. In. World Shrimp Farming, San Diego, 2006 (19): 1-164, City.

10- Sbordoni, V.E., De Matthaeis, E., Cobolli, S.M., La Rosa, G. and Mattoccia, M. 1986. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicas* (Crustacea, Decapoda). Aquaculture, 57,239-251.

11- Valles-Jimenez, R., Cruz, P., Perez-Enriquez, R., 2004. Population genetic structure of Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) from Mexico to Panama: microsatellite DNA variation. Marine Biotechnology 6, 475-484.

Evaluation the genetic indexs of imported *Litopenaeus vannamei* from Hachery center of Bushehr Province

Mohammad Khalil Pazir[1], Abbasali Zendehbodi[1], Soghra Ashraf[2], Ali Ghawampour[1], Esmaeil Ashouri[2], Naser Mirshekari[2], Mandana Shamsizadeh[2]

dr.pazir@gmail.com

1- Shrimp Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Bushehr, Iran.

2- Fishery Office of Bushehr Province

Abstract:

The aim of this study was to evaluate the genetic indices of *Litopenaeus vannamei* imported and rearing from hachery center of Bushehr province, in order to prevent genetic deprression next generation . Due to outbreak of white spot virus disease in 2015, private hachery centers have imported broodstook during 2016-2017 form Molokaei Broodstock Company. This study showed that source of broodstocks consisted of two crowds Molokaei Broodstock Company (F0-95, F0-96) and broodstock rearing from imported broodstock in 2016 (F1-96). Sampling was conducted from muscle tissue of broodstocks differnet generation. DNA extraction of samples was done based on CTAB method. Amplification sequences repeated of DNA was done using microsatellite primers by ThermoCycler device. The results indicated that mean of alleles and genetic diversity in the offspring of imported broodstock rearing (F1-96) was significantly higher than the imported broodstock. Also, the highest inbreeding in imported broodstock was calculated (F0-96). However, there was no significant difference in the amount of this index in broodstock F1-96 and F0-95.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, Allele, Genetic diversity, inbreeding