بررسی ژنتیکی مولدین میگوی وانامی مراکز تکثیر چوئبده آبادان

حسین هوشمند[1]، مینا آهنگرزاده[1]، حسین ذوالقرنین[2]، سیدرضا سیدمرتضایی[3]، سرور خردپژوه[4]

1- پژوهشکده آبزی پروری آبهای جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.

2- دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، گروه زیست شناسی دریا.

3- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

4- دانش آموخته دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

چکیده

میگوی پاسفید غربی (وانامی) یک گونه اقتصادی و غیر بومی ایران می باشد که به سیستم های پرورش میگو در ایران معرفی شده است. در مراکز تکثیر منطقه جنوب غرب ایران (چوئبده) از سه جمعیت احتمالی نسل اول و نسل دوم تکثیر شده در منطقه چوئبده و نسل چهارم تکثیر شده در کوهستک هرمزگان برای تکثیر و تولید پست لارو استفاده می شد. به منظور بررسی خویشاوندی احتمالی، ساختار ژنتیکی این میگوها با استفاده از نشانگر مولکولی 16SrRNA موردبررسی قرار گرفت. بر اساس تجزیه و تحلیل نتایج 6 هاپلوتایپ برای میگوهای مورد مطالعه بدست آمد. اختلاف ژنتیکی F_{st} بین مولدین نسل اول(f) و نسل دوم (f2) مقدار 0/29730 و فاکتور Nm یا جریان ژنی مقدار 0/59 بدست آمد. F_{st} بین مولدین نسل اول و نسل چهارم 0/04762 و جریان ژنی 5 بدست آمد. واگرایی تخمینی برای جمعیت مولدین نسل اول با نسل دوم برابر 0/013 و نسل دوم با نسل چهارم برابر 0/002 و نسل اول با نسل چهارم برابر با 0/012 بود. واگرایی جمعیت با جمعیت های وانامی ثبت شده در بانک جهانی 0/002 مقدار فاصله داشت.نتایج حاکی از فاصله اندک ژنتیکی میان سه جمعیت مورد بررسی بود که می تواند به دلیل رانش ژنی تصادفی و یا اثر مؤسس در محیط های بسته پرورشی باشد.

واژگان کلیدی: ساختار ژنتیکی، میگوی وانامی، آبادان

مقدمه

یکی از راه‌های بررسی ساختار ژنتیکی آبزیان مطالعه‌ی ژنتیک جمعیت‌های یک گونه‌ی خاص است. همچنین شناسایی تحولات درون گونه‌ای و ساختار جمعیت یکی از نیازهای اساسی در اعمال مدیریت صحیح و بهره‌برداری پایدار از ذخایر ژنتیکی می‌باشد. از طرفی به منظور ارزیابی وضعیت موجود زنده از نظر تنوع ژنتیکی در صورت وقوع استرس‌های محیطی نیاز به تعیین دقیق میزان تنوع در جمعیت‌ها می‌باشد تا در صورت کاهش تنوع در گونه، در زمان مناسب با مدیریت صحیح بتوان از خطر انقراض گونه‌ها جلوگیری به عمل آورد. ارزیابی تنوع ژنتیکی در پرورش درون‌آمیزی می‌تواند باعث بهبود مدیریت مولدین و حمایت از پرورش‌دهندگان برای به حداقل رساندن معایب پرورش درون‌آمیزی باشد(Francisco and Galetti.,2005). هدف از این مطالعه بررسی سه جمعیت مولد میگوی وانامی به منظور پایش سطح تنوع پیش مولدین مزارع پرورش میگو بوده است.

مواد و روش کار

از تعداد 20 عدد مولدین نسل اول تکثیر شده در چوئبده آبادان(F1)، 20 عدد نسل دوم مولدین تکثیر شده در چوئبده آبادان(F2) و20 عدد نسل چهارم تکثیر شده در کوهستک هرمزگان(F4) هرکدام دو پای شنا قطع و در الکل نگهداری شد. جهت استخراج DNA از روش کیت استخراج PRIME5 ساخت آمریکا و برنامه طراحی این شرکت برای بافت‌های الی استفاده گردید. جهت تعیین خلوص، کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب از دستگاه‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز استفاده شد. دو پرایمر جهانی ثبت شده مورد استفاده قرار گرفت.

A20120625-024	5′CGCCTGTTTAACAAAAACAT3′	Forward16S rRNA
A20120625-024	5′CCGGTCTGAACTCAGATCACGT3′	Reverse16S rRNA

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر اساس مقادیر مشخص انجام شد و پس از اتمام مراحل دمایی محصول PCR بر روی ژل آگاروروز و در دستگاه مستند ساز ژل بررسی شد. برای داشتن بهترین محصول PCR با آزمون و خطا بر روی الگوی دمایی مراحل مختلف و همچنین تغییر نسبت‌های DNAهای الگو و Mgcl2 بهترین غلظت و دما برای هر نمونه به دست آمد. تعداد 18 نمونه توالی یابی شد و سپس نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک جهانی تطابق داده شد. جهت هم‌تراز کردن توالی‌ها از نرم‌افزار CLUSTUL_W و نرم افزار MEGA ver 5.2 جهت رسم درخت تبارزایی، تخمین میزان واگرایی و آماده کردن توالی ها برای استفاده در نرم افزار DNAsp ver 5 به کار برده شدند.

نتایج:

پس از دریافت توالی‌ها با تطابق آن با توالی‌های ثبت شده مربوط به S rRNA16 وانامی از صحت توالی‌ها اطمینان حاصل شد. توالی‌های به دست آمده مورد مطالعه‌ی فیلوژنیک قرار گرفت و درخت‌های تبارزایی آن‌ها به دو روش پیوند همجواری روش گروه وزنی از طریق میانگین حسابی محاسبه شد. در این بررسی با روش پیوند همجواری جمعیت لیتوپنئوس وانامی مولدین f1در کنار دیگر لیتوپنئوس وانامی‌های ثبت شده در یک کلاستر قرار گرفت و جمعیت‌های مولدین f2و f4 در کلاستری جداگانه ولی با ارتباطی نزدیک نشان داده شد. میگوی پنئوس‌مودون و فارفانات‌پنئوس در کلاسترهای جداگانه‌ای قرار گرفتند. جهت تخمین واگرایی از نرم افزار 5.2 MEGA Ver استفاده شد. میزان واگرایی(d) برای جمعیت مولدین f1با مولدین f2 مقدار 0/013، جمعیت مولدین f2 با مولدین f4 مقدار 0/002 و جمعیت مولدین f1 با مولدین f4 مقدار 0/012 به دست آمد. میزان واگرایی جمعیت مولدین f1 در مقایسه با پنئوس موندون مقدار 0/125 و با Farfantepenaeus subtilis مقدار 0/103 و با جمعیت‌های وانامی ثبت شده در بانک جهانی مقدار 0/002 تخمین زده شد.

بحث و نتیجه گیری:

از عوامل مهم در مدیریت و برنامه ریزی ذخایر آبزیان شناخت ساختار ژنتیکی است. در موقعیت هایی که براساس ویژگیهای ظاهری یا خصوصیات رفتاری آبزیان نمی توان آن ها را شناسایی و تعیین ساختار ژنتیکی نمود از روش های ژنتیک مولکولی استفاده می شود (Magoulas., 2005). در این مطالعه مقدار فاکتور Nm برابر 0/61 به دست آمد. هرگاه مقدار Nm بیشتر از یک باشد، جریان ژنی اصلی ترین عامل در ایجاد تمایز ژنتیکی و هرگاه مقدار این فاکتور کمتر از یک باشد، رانش ژنتیکی عامل اصلی تمایز ژنتیکی است(Li et al., 2007) بر همین اساس در این مطالعه جریان ژنی عامل تمایز ژنتیکی نمی باشد. همچنین، نتیجه آزمون Tajima D-Test مقدار 0/69933- را نشان می دهد، که با توجه به شرط این نتیجه معنی دار نمی باشد. تنوع نوکلئوتیدی در مولدین f1 برابر0/01008، در مولدین f2 برابر 0/00221 و در مولدین f4 برابر 0/00095 به دست آمد. همه ی جانشینی ها از نوع منفرد بودند و بررسی تنوع نوکلئوتیدی و جایگاه های پلی مورفیسم تغییرات چشمگیری را نشان نداد که این حاکی از درون آمیزی بین نسل های میگوهای پرورشی است. جهت محاسبه تفاوت ژنتیکی درون و بین جمعیت ها از شاخص F استفاده شد، این شاخص توسط Wright ابداع گردید و شامل سه شاخص FIT,FIS,FST می باشد، شاخص Fst برای مطالعه تفاوت بین جمعیت ها بکار می رود. مقدار Fst بین صفر تا 0/05 نشان دهنده تمایز ژنتیکی پایین، بین 0/05 تا 0/15 تمایز متوسط و بین 0/15 تا 0/25 تمایز بالاست و مقدار بالای 0/25 تمایز ژنتیکی خیلی بالا را نشان می دهد. براساس نتایج به دست آمده. اختلاف ژنتیکی Fst بین مولدین f1 و جمعیت مولدین f2 مقدار0/29730 و فاکتور Nm یا جریان ژنی مقدار 0/59 تخمین زده شد، Fstبین مولدین f1 و مولدین f4 مقدار 0/3333 و فاکتور Nm مقدار 0/5 محاسبه شد و Fstبین مولدین f2 و مولدین f4 مقدار 0/04762 و فاکتور Nm مقدار5 به دست آمد. بررسی های حاصل از تنوع نوکلئوتیدی، رانش ژنی و فاصله ژنتیکی نشان می دهد که تمایز معناداری در بین جمعیت های پرورشی مورد مطالعه یافت نشد(به دلیل قرار گرفتن در محیط های بسته). یکی از علت های این نتیجه، احتمالا مربوط به رنج تکاملی آهسته ناحیه S rRNA16 است. زیرا از مطالعه ناحیه S rRNA 16 بیشتر به منظور جدایی گونه ها و سپس جدایی درون گونه ایی استفاده می شود. بر طبق نتایج فاصله ی ژنتیکی اندک مشاهده شده به دلیل رانش ژنی تصادفی اندک و یا اثر موسس در

محیط های بسته پرورشی است و جهش های رخ داده در طی زمان نقش موثری ندارند. به نظر می رسد ژنوم مطالعه شده به تغییرات تصادفی مانند رانش ژنتیکی مستعدتر است، زیرا ژنوم میتوکندری از مادر به ارث برده می شود(Perez-Enriquez., 2009).

منابع:

Francisco, A.K., Galetti, Jr., P.M., 2005. Genetic distance between broodstock of the marine shrimp Litopenaeus vannamei (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA analyses. Genet. Mol. Biol, 28: 258–261.

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