

بررسی شاخص‌های ژنتیکی جمعیت‌های مختلف مولدین میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مراکز تکثیر استان بوشهر

چکیده

باهداف تعیین شاخص‌های ژنتیکی سه ذخیره مختلف از پیش مولدین میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) نگهداری شده در مرکز تکثیر بندرگاه استان بوشهر به منظور شناسایی جمعیت‌های مختلف بر اساس روش مولکولی ریز ماهواره‌ای، مطالعه‌ای در مهر تا آبان ماه سال ۱۳۹۹ انجام شد. از هر ذخیره ۳۰ قطعه میگوی نر و ماده به طور مساوی نمونه‌گیری و در الکل ۹۵ درصد نگهداری شدند. پس از استخراج DNA با استفاده از ۹ جفت نشانگرهای ریز ماهواره‌ای، شاخص‌های ژنتیکی شامل تنوع ژنتیکی، فراوانی آلل‌ها، ضریب هم‌خونی، فاصله ژنتیکی، شباهت ژنتیکی و تمایز ژنتیکی آن‌ها تعیین شد. نتایج نشان داد که دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده در سه ذخیره هیبرید (Hibrid)، های‌هلت (High Health) و مولوکائی (Molokaei) به ترتیب در دامنه ۰/۱۱-۰/۷، ۰/۱۶-۰/۸۵ و ۰/۲۱-۰/۹ قرار داشت، لیکن علیرغم کمتر بودن تنوع ژنتیکی دو ذخیره هیبرید (H) و های‌هلت (H.H) نسبت به ذخیره مولوکائی (M) هیچ‌گونه اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد. باوجوداینکه فراوانی آلل‌ها در هر سه ذخیره در دامنه ۲-۹ قرار داشت، لیکن میزان آلل‌های اختصاصی برای ذخیره‌های هیبرید، های‌هلت و مولوکائی به ترتیب $0/37 \pm 0/18$ ، $0/0 \pm 0/36$ و $0/0 \pm 0/14$ تعیین گردید. همچنین میزان ضریب هم‌خونی به‌دست‌آمده در ذخیره مولوکائی، های‌هلت و هیبرید به ترتیب ۰/۳۱، ۰/۴۱ و ۰/۳۱ محاسبه شد. لذا به دلیل پائین بودن میزان تمایز ژنتیکی و شباهت بالای ژنتیکی ذخیره‌های مولوکائی و هیبرید (۰/۱۱۷ و ۰/۱۳۵) و همچنین فاصله ژنتیکی زیاد میان آن‌ها با ذخیره های‌هلت (۰/۶۱۵) باهدف افزایش تنوع ژنتیکی، پیش مولدین دو ذخیره مولوکائی و هیبرید به‌عنوان جمعیت اول و پیش مولدین های‌هلت به‌عنوان جمعیت دوم معرفی شدند.

واژگان کلیدی: میگوی سفید غربی، ریز ماهواره، شاخص‌های ژنتیکی، جمعیت، بوشهر.

مقدمه

از زمان شروع صنعت تکثیر و پرورش میگو از سال ۱۹۳۴ میلادی، تاکنون بیش از پنجاه کشور به توسعه این صنعت مبادرت ورزیده‌اند، لیکن امروزه با توجه به رشد سریع جمعیت و افزایش تقاضا جهت مصرف غذاهای دریایی، تولید برخی از گونه‌های این خانواده به‌صورت تجاری صورت می‌گیرد، در میان گونه‌های آبی میگوهای خانواده پنائیده از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی بوده که در سال ۲۰۱۹ میزان تولید آن‌ها به رقمی بالغ بر ۵/۸ میلیون تن رسیده است (FAO, 2019). در این راستا شروع مطالعات پرورش میگو در کشور از سال ۱۳۶۸ بر مبنای سیستم نیمه متراکم در استان‌های بوشهر، هرمزگان و خوزستان بر اساس پرورش میگوی سفید هندی (*Penaeus indicus*) بوده است (متین‌فر و همکاران، ۱۳۸۸).

محمد خلیل پذیر^۱

سید احمد قاسمی^۲

خسرو آئین‌جمشید^۳

۱. پژوهشکده میگوی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی (AREO)، بوشهر، ایران.
۲. گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده خلیج‌فارس، دانشگاه خلیج‌فارس بوشهر، ایران.

*مسئول مکاتبات:

dr.pazir@gmail.com

کد مقاله: ۱۴۰۰۱۰۸۶۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۳۰

مقاله پژوهشی و برگرفته از طرح پژوهشی است.

بررسی شاخص‌های ژنتیکی جمعیت‌های مختلف مولدین میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مراکز تکثیر استان بوشهر / پذیر و همکاران

لیکن پس از شیوع بیماری ویروسی لکه سفید در میگوهای پرورشی سفید هندی، موسسه تحقیقات شیلات ایران در سال ۱۳۸۴ باهدف ایجاد تنوع گونه‌ای و مقابله با مشکلات به وجود آمده ناشی از شیوع بیماری اقدام به معرفی میگوهای عاری از بیماری خاص سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) به کشور نمود (پذیر و همکاران، ۱۳۹۸). امروزه مشاهده می‌شود به دلیل اشتغال‌زایی و سودآوری بالای صنعت میگو در کوتاه‌مدت، توسعه آن در استان‌های ساحلی با تکیه بر پرورش میگوی سفید غربی شکل گرفته است. با توجه به غیربومی بودن این گونه همواره این خطر وجود دارد که به دلیل مشکلات ناشی از ورود مولدین عاری از بیماری خاص و عدم انتخاب ذخیره‌های مختلف در مراکز تکثیر صنعت میگو در کشور دچار بحران شود. لذا حفظ ذخایر ژنتیکی و دسترسی به مولدین به‌گزین شده از ضروریات این صنعت می‌باشد (Cock et al., 2017; Ren et al., 2020a). با این وجود اجرای برنامه‌های اصلاح نژادی و مدیریت منابع شیلاتی نیازمند داشتن اطلاعات دقیق از ساختار ژنتیکی جمعیت‌های میگو و تنوع ژنتیکی مرتبط با آن‌ها است. امروزه استفاده از تکنیک‌های پیشرفته مولکولی توانسته تفاوت بین افراد را در سطح مولکول DNA مشخص نمایند، به‌طوری‌که علاوه بر تعیین تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و نژادهای مختلف به ابزار قابل‌اعتمادی در این راستا تبدیل شده‌اند (Loughnan et al., 2016). از جمله روش‌های ژنتیکی مورد استفاده در شناسایی جمعیت‌های مختلف میگو روش مولکولی ریز ماهواره‌ای می‌باشد (Ren et al., 2018). نشانگرهای مولکولی ریز ماهواره‌ای توالی‌های ساده تکرارشونده ۶-۱ نوکلئوتیدی در بخش‌های مختلف توالی DNA هستند که می‌توان با سنجش آن‌ها، اطلاعات مورد نیاز در رابطه با تفاوت‌های ژنتیکی و جایگاه‌های متنوع موجود در میان جمعیت‌ها یا ذخیره‌های مختلف یک ارگانیسم را آشکار سازد. لیکن یکی از الزامات بررسی جمعیت‌های آبزیان به‌ویژه میگو اطلاع از منشأ مولدین در منطقه می‌باشد. لذا با توجه به معرفی میگوی سفید غربی به کشور متأسفانه هیچ‌گونه اطلاعات مستندی در خصوص منشأ مولدین وارداتی به کشور وجود نداشت، از این رو پژوهشکده میگوی کشور برای اولین بار در سال ۹۶ با ردیابی مولدین وارداتی به کشور منشأ آن‌ها را مشخص نمود. شایان‌ذکر است که بر اساس اطلاعات به‌دست‌آمده مشخص شد که میگوهای سفید غربی در جهان از چهار مرکز انستیتو اوشنیک (The Oceanic Institute (OI)، مرکز آبی‌پروری های‌هلت (High Health Aquaculture Inc.)، سواحل دریایی کانابای (Kona Bay Marine Resources (now IAI Co.) و مزارع پرورشی مولوکائی (Molokai Sea Farms) منشأ گرفته‌اند (پذیر و همکاران، ۱۳۹۶). با توجه به اطلاعات موجود مشخص شد که از سال ۸۴ تا سال ۹۶ واردات مولدین میگوی سفید غربی به داخل کشور توسط بخش خصوصی از دانشگاه هلونولو واقع در منطقه هاوایی، سواحل کانابای، سواحل مولوکای، میگوهای های‌هلت مرکز انستیتو Oceanic و در نهایت در سال ۹۶ از شرکت Molokai broodstock واقع در جزایر هاوایی صورت گرفته است (Pazir et al., 2016). با این وجود در طی سال‌های اخیر به دلیل مشکلات اقتصادی و تحریم‌های بین‌المللی بخش خصوصی قادر به واردات مولد به کشور نبوده، لیکن این مراکز بالاچار از مولدین پرورش‌یافته در شرایط آب و هوایی کشور استفاده نموده‌اند. از این رو فعالین این حوزه همواره سعی کرده‌اند که به‌منظور جلوگیری از افزایش هم‌خونی نتایج، مولدین خود را از مناطق مختلف جمع‌آوری نمایند که این فرآیند همواره بدون آگاهی از شاخص‌های ژنتیکی آن‌ها صورت می‌گیرد. لذا در این مطالعه سعی شد که به دلیل محدود بودن جمعیت‌های میگوی سفید غربی در کشور و عدم واردات مولد باهدف به‌گزینی مولدین مراکز تکثیر علاوه بر شناسایی جمعیت‌های مختلف، شاخص‌های ژنتیکی مولدین نگهداری شده در مرکز تکثیر بر اساس روش مولکولی ریز ماهواره‌ای تعیین گردد تا از داده‌های به‌دست‌آمده برای آگاه‌سازی مدیران مراکز تکثیر جهت انتخاب بهترین رویکرد برای تولید ذخایر بنیادی محصور شده با بالاترین میزان تنوع ژنتیکی به‌منظور کنترل سطح هم‌خونی جمعیت‌های پرورشی بومی‌شده در کشور استفاده شود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در مرکز تکثیر بندرگاه استان بوشهر وابسته به پژوهشکده میگوی کشور از مهر تا آبان ماه سال ۱۳۹۹ انجام شد. با توجه به نگهداری سه ذخیره مختلف مولوکائی (Molokai)، های‌هلت (High Health) و هیبرید (Hybrid) در مرکز به‌منظور انجام مطالعات مولکولی از میگوهای نگهداری شده در هر ذخیره به‌طور جداگانه تعداد ۳۰ قطعه عضله پای شنا، در مجموع ۹۰ عدد نمونه، نمونه‌گیری شد نمونه‌ها تا زمان استخراج ماده ژنتیکی DNA در الکل ۹۵ درصد نگهداری شد. استخراج ماده ژنتیکی DNA نمونه‌ها بر اساس روش (CTAB (Conventional Cetyl Trimethylammonium Bromide) صورت پذیرفت (Valles-Jimenez *et al.*, 2004). روش کار به‌اختصار به این صورت بود که بعد از جداسازی ۵۰ میلی گرم از بافت عضله و افزودن محلول CTAB ۱ درصد و پروتئیناز K بعد از هموژنیزه نمودن، نمونه‌ها به مدت ۲-۳ ساعت تا زمان حل شدن قطعات بافتی در درجه حرارت ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس با افزودن محلول کلروفرم و فتل با نسبت ۲۴ به ۱ و شستشو با اتانول ۷۰ درصد استخراج DNA انجام گردید. به‌منظور تعیین کیفیت و کمیت DNA های استخراج‌شده به ترتیب بر اساس وجود یا عدم وجود باند از ژل آگاروز ۱ درصد و نانودراپ مدل A&E Lab در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ نانومتر و نسبت $\frac{260}{280}$ نانوگرم بر میکرو لیتر موردبررسی قرار گرفتند (García-Alegría *et al.*, 2020).

تکثیر توالی‌های تکراری DNA های نمونه‌های استخراج‌شده از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction) با استفاده از ۹ جفت نشانگر اختصاصی پلی مورفیک میگوی سفید غربی ساخته‌شده توسط شرکت متابیون آلمان به سفارش شرکت سهامی خاص روبین طب صورت پذیرفت (Cruz *et al.*, 2004؛ Freitas *et al.*, 2007) (جدول ۱ جدول ۱).

جدول ۱: توالی نشانگرهای استفاده‌شده در تکثیر توالی‌های تکراری ریز ماهواره‌ای میگوهای سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) (سال ۱۳۹۹).

نشانگر	توالی اسیدهای نوکلئوتید (۵' ← ۳')	سایز (bp)
Lvan01 (Freitas <i>et al.</i> , 2007)	F: GCCATAAACGCAAGACTGAG R: GCAGGTATACGGTCATGTGTA	136-146
Lvan07 (Freitas <i>et al.</i> , 2007)	F: AAAGAGGAAGATGAGGAAG R: CCTCGGTTACGTATTTATTG	189-223
Pvan0013 (Cruz <i>et al.</i> , 2004)	F: TGCTCTGGTAACGACAAACG R: AGACCTGTGGCGAAGTGC	276-284
Pvan1758 (Cruz <i>et al.</i> , 2004)	F: TATGCTCGTTCCCTTTTGCTT R: TTGAAGGAAAAGTGTGGGG	163-189
Pvan1815 (Cruz <i>et al.</i> , 2004)	F: GATCATTCGCCCCCTCTTTT R: ATCTACGGTTCGAGAGCAGA	126-141
TUMXLv5.27 (Meehan <i>et al.</i> , 2003)	F: CAGACCCTAAATCTCCGTGC R: TGGAAAGGTCAGAGGTCACG	166-182
TUMXLv5.38 (Meehan <i>et al.</i> , 2003)	F: CCTTTATGACTTCCCCCGAC R: CCGTACAGAAACGGAACGTC	200-222
TUMXLv8.32 (Meehan <i>et al.</i> , 2003)	F: TTACCGCCTAAGAGCGAATG R: TGTCTTTTCGTACCAGTCAAG	216-228
TUMXLv8.2 (Meehan <i>et al.</i> , 2003)	F: TTACCGCCTAAGAGCGAATG R: TGTCTTTTCGTACCAGTCAAG	230-248

در این مطالعه از دستگاه ترموسایکلر مدل Corrbet جهت تکثیر توالی‌های تکرارشونده DNA (ماکروساتلایت) استفاده شد. تکثیر نشانگرها توسط دستگاه ترموسایکلر از سه مرحله تشکیل‌شده بود، بدین‌صورت بود که مرحله اول شامل واسرشت شدن اولیه (Pre denature) در درجه

بررسی شاخص‌های ژنتیکی جمعیت‌های مختلف مولدین میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مراکز تکثیر استان بوشهر / پذیر و همکاران

حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه برای یک چرخه، مرحله دوم شامل واسرشت شدن (Denature) در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال به قطعه هدف (Annealing) در درجه حرارت ۶۰-۵۴ درجه سانتی‌گراد و بسط شدن (Extraction) در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه برای ۳۰ چرخه تنظیم گردید. در انتها بسط نهایی (Final Extraction) در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در یک چرخه صورت پذیرفت. در ادامه بعد از تزریق ۵ میکرو لیتر محصول PCR به درون چاهک‌های ایجادشده بر روی ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد همراه با نشانگر استاندارد ۳۰۰-۱۰۰ جفت باز (Base pair)، پس از ران نمودن دستگاه الکتروفورز عمودی مدل Amersham Se600 به مدت ۲ ساعت ۳۰ دقیقه و رنگ‌آمیزی ژل پلی آکریل آمید با نیترات نقره ۰/۱ درصد، طول هر باند با توجه به طول نشانگر استاندارد محاسبه شد (Borrell et al., 2004). در ادامه با استفاده از نرم‌افزار Gene Alex (ver. 6) برای هر نشانگر مقادیر فراوانی آلل‌های مؤثر و واقعی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده، ماتریکس شباهت و فاصله ژنتیکی (Nei, 1978)، تعادل هاردی-واینبرگ، تفاوت ژنتیکی (Fst)، جریان ژنی، ضریب هم‌خونی (Fis) تعیین شد (Doyle, 2016). همچنین میزان آلل‌های نول با استفاده از نرم‌افزار Micro-Checker (ver. 2.2.3) تعیین گردید. درخت موضع شناسی تکاملی بین نمونه‌ها بر اساس فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار TFGPA ترسیم گردید. در پایان مطالعه با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (Ver:18) از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA با استفاده از آزمون Tukey's با سطح اطمینان ۹۵ درصد فراوانی آلل‌های مؤثر، هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده، هتروزیگوسیتی قابل انتظار و ضریب هم‌خونی ذخیره‌های مختلف میگو، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی میزان تنوع ژنتیکی مولدین میگوی سفید غربی سه جمعیت بررسی‌شده نشان داد که دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده (H_o) در جمعیت‌های هیبرید (H)، های‌هلت (H.H) و مولوکائی (M) به ترتیب ۰/۱۱-۰/۷، ۰/۱۶-۰/۸۵ و ۰/۲۱-۰/۹ می‌باشد. این در حالی بود که حداکثر و حداقل هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) در جمعیت‌های فوق به ترتیب ۰/۴۳-۰/۸۵، ۰/۴۸-۰/۸۲ و ۰/۱۹-۰/۸۳ محاسبه شد. همچنین مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده در دو جمعیت هیبرید و های‌هلت به‌طور معنی‌داری کمتر از مقادیر مرتبط با هتروزیگوسیتی مورد انتظار بود ($P < ۰/۰۵$). با این‌وجود علیرغم کمتر بودن میزان هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جمعیت مولوکائی هیچ‌گونه تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$).

بیشترین تعداد آلل واقعی (Na) مشاهده‌شده در جمعیت‌های هیبرید، های‌هلت هر کدام با ۹ و در جمعیت مولوکائی با میزان ۸ همگی مربوط به نشانگر Lava07 بود. با این‌وجود دامنه آلل‌های واقعی مشاهده‌شده در سه جمعیت مورد بررسی در دامنه ۹ - ۲ قرار داشت. در رابطه با آلل‌های مؤثر (Ne) نتایج نشان داد که حداکثر و حداقل آن در جمعیت هیبرید، های‌هلت و مولوکائی به ترتیب ۱/۷۶-۵/۶، ۱/۹۳-۵/۵۵ و ۱/۲-۵/۸۸ می‌باشد. از سوی دیگر فراوانی آلل‌های واقعی در سطح بیشتر از ۵ درصد ($\geq ۵\%$) در جمعیت‌های هیبرید، های‌هلت و مولوکائی به ترتیب ۰/۷۵±۰/۳۶، ۰/۳۷±۰/۱۸ و ۳/۸۷±۰/۵۸ و ۴/۰±۷۵/۵۹، ۴/۰±۸۷/۶۶ بود لیکن هیچ‌گونه آلل اختصاصی برای جمعیت مولوکائی مشاهده نشد. با این‌وجود فراوانی آلل‌های اختصاصی در سطوح بیشتر از ۲۵ ($\geq ۲۵\%$) و ۵۰ ($\geq ۵۰\%$) صفر بود، لیکن هیچ‌گونه تنوعی بالاتر از این اعداد مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲: آلل‌های اختصاصی و فراوانی آن‌ها جمعیت هیبرید و های‌هلت در نشانگرهای مختلف (سال ۱۳۹۹).

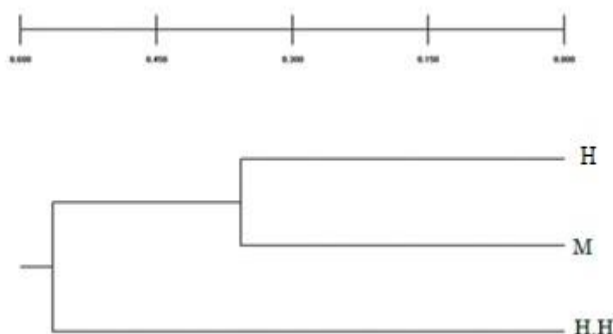
جمعیت	نشانگر	آلل اختصاصی	فراوانی
هیبرید (H)	Pvan 1815	۴	۰/۲۲۵
	TUMXLv 5.27	۶	۰/۱۰۰
	TUMXLv 8.32	۸	۰/۱۰۵
های‌هلت (H.H)	Lvan 07	۱۱	۰/۰۷۵
	Pvan 0013	۴	۰/۴۵۰
	Pvan 1758	۱	۰/۱۲۵
	Pvan 1758	۲	۰/۲۷۵
	Pvan 1758	۳	۰/۱۵۰
	TUMXLv 8.32	۲	۰/۰۲۵

بررسی ضریب هم‌خونی جمعیت‌های مختلف نشان داد که میزان این ضریب در جمعیت‌های موردبررسی به دلیل کاهش میزان تنوع ژنتیکی (هتروزیگوسیتی) مثبت می‌باشد. لیکن در جمعیت هیبرید و های‌هلت به ترتیب در دو نشانگر Pvan0013 و TUMXLv 5.27 این میزان منفی بود. در جمعیت مولوکائی ضریب هم‌خونی در چهار نشانگر Pvan 1815، Pvan0013، TUMXLv 5.27 و TUMXLv 5.38 نیز منفی محاسبه گردید.

با این‌وجود میزان تمایز ژنتیکی موجود میان جمعیت‌های مختلف حاکی از وجود یک تمایز ژنتیکی پائین تا متوسط بود. به‌گونه‌ای که تمایز ژنتیکی موجود میان جمعیت‌های های‌هلت و مولوکائی با ۰/۱۸۲ در سطح متوسط قرار داشت که از لحاظ آماری کاملاً معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۱$). این در حالی بود که تمایز ژنتیکی موجود بین جمعیت های‌هلت و هیبرید و همچنین جمعیت هیبرید و مولوکائی به ترتیب ۰/۱۳۵ و ۰/۱۱۷ بود که این میزان به‌طور معنی‌داری در سطح پائین تمایز ژنتیکی قرار داشت ($P < ۰/۰۱$). در رابطه با مقادیر جریان ژنی (ارتباطات ژنتیکی) میان جمعیت‌های مختلف بیشترین میزان میان جمعیت‌های هیبرید و مولوکائی و کمترین میزان میان جمعیت های‌هلت و مولوکائی بود. همچنین بیشترین میزان فاصله ژنتیکی میان جمعیت های‌هلت و مولوکائی و کمترین میزان میان جمعیت‌های هیبرید و مولوکائی و بیشترین شباهت ژنتیکی نیز میان جمعیت هیبرید و مولوکائی مشاهده شد (Nei, 1978) (جدول ۳) (شکل ۱).

جدول ۳: مقادیر فاصله موجود در میان جفت جمعیت‌های مورد مطالعه (سال ۱۳۹۹).

جمعیت	فاصله ژنتیکی	
	هیبرید	های‌هلت
های‌هلت	۰/۵۱۲	
مولوکائی	۰/۳۵۷	۰/۶۱۵



شکل ۱: درخت موضع شناسی تکاملی بر اساس فاصله ژنتیکی مولوکائی (M)، های هلت (H.H) و هیبرید (H) (بر اساس معیار Nei, 1972) (سال ۱۳۹۹).

همچنین بر اساس آزمون مربع کای (χ^2) در هر سه جمعیت هیبرید، های هلت و مولوکائی در نشانگرهای مختلف ریز ماهواره انحراف از تعادل هاری واینبرگ مشاهده شد ($P < 0.05$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$). به‌استثنای نشانگر Pvan 0013 در جمعیت هیبرید، نشانگرهای TUMXLv 5.38 و TUMXLv 8.32 در جمعیت های هلت و نشانگرهای Pvan 1815، Pvan 0013 و TUMXLv 5.27 و TUMXLv 5.38 در جمعیت مولوکائی که هیچ‌گونه اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه بهبود ژنتیکی یک گزینه مهم برای افزایش سودآوری در بخش آبی‌پروری است (Gjedrem *et al.*, 2012). امروزه گزارشات زیادی مبنی بر از بین رفتن یا کاهش تنوع ژنتیکی در انواع گونه‌های آبی‌پرورش‌یافته در مراکز محصورشده شامل میگوهای دریایی، میگوهای آب شیرین، ماهیان باس دریایی، صدف‌ها خوراکی و مروارید ساز ارائه‌شده است (Bala *et al.*, 2017; Knibb *et al.*, 2020). لیکن یکی از راهکاری اساسی افزایش بهره‌وری، ایجاد آمیزش بین گروهی ذخایر پرورش داده‌شده به‌منظور بالا بردن هتروزیگوسیتی در نتایج حاصله می‌باشد (Hillen *et al.*, 2017)، باین‌وجود استفاده از تلاقی درون گروهی میان افراد خانواده‌های مختلف می‌توانند منجر به افزایش میزان هتروزیگوسیتی و تنوع ژنتیکی در نتایج گردد. میگوی سفید غربی به‌عنوان مهم‌ترین گونه میگوی پرورشی، امروزه به‌سرعت جایگزین گونه‌های بومی در مناطق پرورشی جهان شده است. قبل از اینکه به‌گزینی ژنتیکی صورت گیرد تخمین وراثت‌پذیری بالا برای صفت رشد تأیید می‌کند که یک مؤلفه قابل‌توجهی از واریانس ژنتیکی افزاینده برای صفت رشد در لاین‌های خانواده‌های میگوی سفید غربی موجود در مراکز تکثیر چین، به‌منظور بهبود تولید نسبی وجود دارد (Ren *et al.*, 2020b). ازاین‌رو بررسی‌های به‌عمل‌آمده در کشور حاکی از آن است که روند انتخاب مولدین میگوی سفید غربی در مراکز تکثیر بیشتر بر اساس صفت رشد می‌باشد، در این روش میگوهای انتخاب می‌شوند که در زمان کوتاه‌تری به حداکثر رشد خود رسیده‌اند (پذیر و همکاران، ۱۳۹۶). این نحوه انتخاب مولد علاوه بر اینکه باعث از بین رفتن شانس مشارکت میگوهای با وزن کمتر در تولید نتایج بعدی می‌گردد می‌تواند با حذف بسیاری از آلل‌های مؤثر نیز همراه شود (Moss *et al.*, 2005; Tamayo, 2006). در این مطالعه تعیین تاریخچه و منشأ ورود مولدین به داخل کشور در طی سال‌های گذشته دلالت بر وجود سه ذخیره مولوکائی، های هلت و هیبرید داشت (Pazir *et al.*, 2016) که بررسی داده‌های حاصل از شاخص‌های ژنتیکی آن‌ها حاکی از کاهش میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های شناسایی‌شده همراه با افزایش میزان ضریب هم‌خونی بود. باین‌وجود به دلیل اختلاف کم میان هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و قابل‌انتظار میزان تنوع ژنتیکی میگوهای

جمعیت مولوکائی در مقایسه با دو جمعیت دیگر در چهار جایگاه به‌طور معنی‌داری بیشتر شده بود، لیکن این اختلاف در هر کدام از ذخیره‌های هیبرید و های‌هلت تنها در یک جایگاه مشاهده شد. این حالت ممکن است به دلیل کاهش تنوع آلی ناشی از کوچک شدن جمعیت پیش مولدین بوده باشد. در این رابطه Perez-Enriquez و همکاران (۲۰۰۹) عنوان نمودند که افزایش میزان هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل‌انتظار علاوه برافزایش میزان تنوع ژنتیکی با کاهش ضریب هم‌خونی می‌تواند همراه گردد. از سوی دیگر میزان ضریب هم‌خونی به‌دست‌آمده در ذخیره‌های پیش مولد مولوکائی، های‌هلت و هیبرید در مطالعه حاضر به ترتیب با میزان ۰/۱۴، ۰/۳۱ و ۰/۴۱ نسبت به مقادیر به‌دست‌آمده در مولدین بومی‌شده میگوی سفید غربی مراکز تکثیر چین با میزان ۰/۰۷ به‌شدت افزایش‌یافته بود. یکی از دلایل افزایش ضریب هم‌خونی در پیش مولدین ذخیره‌های مختلف، کاهش جمعیت مؤثر مولدین مشارکت‌کننده در برنامه‌های تولیدمثلی و عدم به‌گزینی مناسب می‌تواند باشد.

Valles و همکاران (۲۰۰۴) عنوان نمودند که تعادل هاری-واینبرگ قادر است که ثبات و فراوانی آلل‌ها را در نسل‌های مختلف موردبررسی قرار دهد. امروزه از این معادله جهت بررسی رابطه میان فراوانی ژنوتیپ و آلل‌ها استفاده می‌گردد (Goyard *et al.*, 2003). با توجه به اینکه افزایش آلل‌های نول می‌توانند موجب افزایش هموزیگوسیتی و کاهش هتروزیگوسیتی در جمعیت‌ها شوند (Castric *et al.*, 2002) لذا به دلیل انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت‌های شناسایی‌شده می‌توان عنوان نمود که انحراف از این تعادل در ذخیره‌های مورد مطالعه علاوه بر کاهش تنوع ژنتیکی و افزایش ضریب هم‌خونی ناشی از وجود آلل‌های نول (Null allele) بوده است (Vallez *et al.*, 2005).

Goyard و همکاران (۲۰۰۳) عنوان نمودند که میزان فراوانی آلل‌های واقعی در جمعیت‌های وحشی در دامنه ۲۷ - ۱۴ قرار دارد، لذا در جمعیت‌های پرورشی به دلیل افزایش آمیزش‌های خویشاوندی و عدم انتخاب درست جمعیت این احتمال وجود دارد که بعد از ۴ تا ۷ نسل میزان فراوانی آلل‌ها به‌شدت با کاهش همراه شود. همچنین Ren و همکاران (۲۰۱۸) با مطالعه بر روی ذخایر میگوی سفید غربی پرورش داده‌شده در مراکز تکثیر کشور چین عنوان نمودند که به دلیل اجرای برنامه‌های به‌گزینی توسط مدیران مراکز تکثیر مولدینی با شاخص‌های ژنتیکی مناسب تولید نموده‌اند، به‌گونه‌ای که میانگین فراوانی آلل واقعی مشاهده شد در آن‌ها با میانگین ۵/۸۵ در دامنه ۱۲/۴۳ - ۴ قرار داشت. این در حالی بود که نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر دلالت بر کاهش فراوانی آلل‌های واقعی در سه جمعیت شناسایی‌شده با دامنه فراوانی ۹ - ۲ بود.

بنابراین هر چه فراوانی آلل‌ها در جمعیت‌های شناسایی‌شده کمتر باشد جمعیت بجای پلی‌مورف شدن به سمت مونومورف شدن پیش خواهد رفت که این حالت معمولاً به دنبال نسل‌گیری متعدد از یک جمعیت و افزایش میزان آمیزش‌هایی خواهر-برادری (Full-sib Family) در جوامع ایجاد می‌شود (Castric *et al.*, 2002)، لذا در جمعیت‌هایی که دچار تنگناهای ژنتیکی (Bottleneck) می‌شوند، به‌ویژه جمعیت‌هایی که در اسارت و یا در محیط‌های بسته نگهداری شده‌اند و یا مراکزی که دسترسی آن‌ها به منابع وحشی غیرممکن است این حالت بیشتر مشاهده می‌شود (Norris *et al.*, 1999)؛ بنابراین ایجاد تنگناهای ژنتیکی علاوه بر کاهش میزان تنوع ژنتیکی و افزایش ضریب هم‌خونی در میگوهای پرورشی، معمولاً با کاهش شدید فراوانی آلی همراه است (Wolfus *et al.*, 1997). لیکن می‌توان با اجرای برنامه‌های به‌گزینی و تعیین شاخص‌های ژنتیکی تا حدود زیادی میزان ضریب هم‌خونی را کاهش داد. باین‌وجود رابطه ژنتیکی بین صفت رشد و صفات تولیدمثلی پیش‌بینی می‌کند که انتخاب میگوهای ماده با رشد سریع باعث افزایش تولید لارو می‌شود، بدون اینکه در کیفیت تخم‌ها تأثیری داشته باشد (Ren *et al.*, 2020a). همچنین Tan و همکاران (۲۰۱۹) عنوان نمودند که به‌گزینی میگوهای ماده بر اساس برآورد شاخص‌های ژنتیکی مرتبط با صفات رشد و تولیدمثل در میگوهای سفید غربی پرورش‌یافته در آب‌های لب‌شور می‌تواند منجر به بهبود این صفات در این جنس شود. باین‌وجود می‌توان توصیه نمود که جهت بهبود شاخص‌های ژنتیکی جمعیت‌های هیبرید با اجداد خود به‌صورت برون جمعیتی آمیزش داشته باشند.

بررسی شاخص‌های ژنتیکی جمعیت‌های مختلف مولدین میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مراکز تکثیر استان بوشهر / پذیر و همکاران

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه به‌منظور بهبود شاخص‌های ژنتیکی در نتایج حاصل از مولدین نگهداری شده در مرکز تکثیر بندرگاه، باهدف کاهش آمیزش‌های خویشاوندی بعد از شناسایی پیش مولدین جمعیت‌های مختلف، انتخاب مولدین از میان آن‌ها صورت گرفت. بررسی تاریخچه پیش مولدین هیبرید حاکی از آن بود که این پیش مولدین نتایج حاصل آمیزش اجداد مولدین مولوکائی و های‌هلت نسل قبل بوده‌اند. لذا با توجه به تمایز ژنتیکی پائین، فاصله ژنتیکی کم و شباهت ژنتیکی بالای میگوهای ذخیره مولوکائی و هیبرید در مقایسه با میگوهای های‌هلت، به‌منظور افزایش تنوع ژنتیکی در پیش مولدین نگهداری شده، این دو ذخیره به‌عنوان جمعیت اول و ذخیره های‌هلت به‌عنوان جمعیت دوم در نظر گرفته شدند. در انتهای مطالعه بر اساس اطلاعات به‌دست‌آمده به‌گزینی و انتخاب مولدین از میان دو جمعیت مجزای مولوکایی و های‌هلت صورت پذیرفت.

منابع

- پذیر، م. خ.، سیمرونی، م. م.، قاسمی، س. ا.، قائدینا، ب.، پور کاظمی، م.، آئین جمشید، خ.، متین‌فر، ع. و افشار نسب، م. ۱۳۹۶. تفاوت‌های ژنتیکی موجود در میگوهای سفید غربی نسل‌های مختلف. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. ۴۶ ص.
- پذیر، م. خ.، قوام‌پور، ع.، اژدری، ا. و نظاری، م. ع. ۱۳۹۸. بررسی ضایعات آسیب‌شناسی آب‌شش سیاه در میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مزارع پرورشی استان بوشهر. زیست‌شناسی دریا. ۱۳۹۸؛ ۱۱ (۱): صفحات ۳۴-۲۵.
- متین‌فر، ع.، مشایی، ن.، دلیرپور، غ.، فقیه، غ.، حق‌نجات، م.، افشارنسب، م.، غریبی، ق. و صالحی، ح. ۱۳۸۸. بررسی امکان معرفی پا سفید (*Litopenaeus vannamei*) به صنعت تکثیر و پرورش میگوی ایران. گزارش نهایی پروژه شماره فروست ۸۸/۵۷۷، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. ۴۷ ص.
- Bala, B., Mallik, M., Saclain, S. and Islam, M. S., 2017. Genetic variation in wild and hatchery populations of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 15(1), 23-30.
- Borrell, Y., Espinosa, G., Romo, J., Blanco, G., Vázquez, E. and Sánchez, J., 2004. DNA microsatellite variability and genetic differentiation among natural populations of the Cuban white shrimp *Litopenaeus schmitti*. Marine Biology 144: 327-333.
- Castric, V., Bernatchez, L., Belkhir, K. and Bonhomme, F., 2002. Heterozygote deficiencies in small lacustrine populations of brook charr *Salvelinus fontinalis* Mitchell (Pisces, Salmonidae): a test of alternative hypotheses. Heredity 89: 27-35.
- Cock, J., Salazar, M. and Rye, M., 2017. Strategies for managing diseases in non-native shrimp populations. Reviews in Aquaculture, 9(3): 211-226.
- Cruz, P., Ibarra, A. M., Mejia-Ruiz, H., Gaffney, P. M. and Pérez-Enríquez, R., 2004. Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Marine Biotechnology 6: 157-164.
- Doyle, R. W., 2016. Inbreeding and disease in tropical shrimp aquaculture: a reappraisal and caution. Aquaculture Research, 47(1): 21-35.
- FAO, 2019. Aquaculture production (quantities and values) 1950–2013. In: FishStatJ- Software for Fishery Statistical Time Series. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome.
- Freitas, P. D., Jesus, C. M. and 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.
- García-Alegría, A. M., Anduro-Corona, I., Pérez-Martínez, C. J., Guadalupe Corella-Madueño, M. A., Rascón-Durán, M. L. and Astiazaran-Garcia, H., 2020. Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA. International Journal of Analytical Chemistry, 2020.

- Goyard, E., Arnaud, S., Vonau, V., Bishoff, V., Mouchel, O., Pham, D., Wyban, J. and Boudry, P., 2003. Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations. *Aquatic Living Resources* 16: 501-508.
- Hillen, J. E. J., Coscia, I., Vandeputte, M., Hertten, K., Hellemans, B., Maroso, F., Vergnet, A., Allal, F., Maes, G. E. and Volckaert, F. A. M., 2017. Estimates of genetic variability and inbreeding in experimentally selected populations of European sea bass. *Aquaculture*, 479: 742-749.
- Knibb, W., Giang, C. T., Premachandra, H. K. A., Ninh, N. H. and Domínguez, B. C., 2020. Feasible options to restore genetic variation in hatchery stocks of the globally important farmed shrimp species, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 518: p.734823.
- Loughnan, S. R., Smith-Keune, C., Jerry, D. R., Beheregaray, L. B. and Robinson, N. A., 2016. Genetic diversity and relatedness estimates for captive barramundi (*Lates calcarifer*, Bloch) broodstock informs efforts to form a base population for selective breeding. *Aquaculture Research*, 47(11): 3570-3584.
- Moss, S. M., Otsoshi, C. A. and Leung, P. S., 2005. Optimizing strategies for growing larger *L. vannamei*. *Global Aquaculture Advocate*, 8(5): 68-69.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3): 583-590.
- Norris, A., Bradley, D., Cunningham, E., 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture* 180: 247-264.
- Pazir, M. Kh., Matinfar, A., Hosseini, J., Ghasemi, A., Ashori, E., Yarahmadi, A., Rasti, W., Shabani, M. J., Ghanaatian, H., Moazedi, J., Zendehebdi, A., Gharibi, Gh., Mirbakhsh, M., Yeganeh, V., Mottalebi, A. A., Afsharnasab, M., Paygozar, S. A., Asadi, A., Sobohi, M., Bahmanabadi, J. M., Ramazani, M., Aeinjamshid, Kh., Ghaednia, B., Ghorbani, R., Mallohi, A., Sharifpor, I. and Pourkazemi, M., 2016. Supply and protected different population of *Litopenaeus vannamei* subadult zero foster (F0) from difference provinces Iran. Tehran, Iran, Iranian Fisheries Science Research Institute, 48pp. (50937).
- Perez-Enriquez, R., Hernández-Martínez, F. and Cruz, P., 2009. Genetic diversity status of White shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* broodstock in Mexico. *Aquaculture* 297, 44-50.
- Ren, S., Mather, P. B., Prentis, P., Li, Y., Tang, B. and Hurwood, D. A., 2020a. Quantitative genetic assessment of female reproductive traits in a domesticated pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) line in China. *Scientific reports*, 10(1): 1-10.
- Ren, S., Mather, P. B., Tang, B. and Hurwood, D. A., 2018. Levels of genetic diversity and inferred origins of *Penaeus vannamei* culture resources in China: Implications for the production of a broad synthetic base population for genetic improvement. *Aquaculture*, 491: 221-231.
- Ren, S., Prentis, P., Mather, P.B., Li, Y., Tang, B. and Hurwood, D.A., 2020b. Genetic parameters for growth and survival traits in a base population of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) developed from domesticated strains in China. *Aquaculture*, 523: p.735148.
- Tamayo, R. J. M., 2006. Assessment of genetic variability in two lots of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) introduced to Cuba.
- Tan, J., Luan, S., Cao, B., Luo, K., Meng, X. and Kong, J., 2019. Evaluation of genetic parameters for reproductive traits and growth rate in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in brackish water. *Aquaculture*, 511: p.734244.
- Valles-Jimenez, R., Cruz, P. and 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.
- Vallez, R., 2005. Thesis: Studies on genetic structure of white shrimp, (*Litopenaeus vannamei*), from Oriental Pacific inferred by microsatellite analysis and DNA mitochondrial. Post-graduate studies. La Paz, Mexico, Biology Investigations Center from Northeast. 74.

بررسی شاخص‌های ژنتیکی جمعیت‌های مختلف مولدین میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مراکز تکثیر استان بوشهر / پذیر و همکاران

Wolfus, G. M., Garcia, D. K. and Alcivar-Warren, A., 1997. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture* 152: 35-47.