مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

# کاربرد روش DNA ریزماهواره‌ای در تعیین تنوع ژنتیکی مولدین پرورش میگوی سفید غربی (*Penaeus vannamei*: Boone, 1931) در مراکز تکثیر استان بوشهر

محمد علی نظاری[۱]، لاله موسوی ده‌موردی *[۱]، محمد امینی چرمهینی[۱]، محمد خلیل پذیر[۲]

۱.گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، بهبهان، ایران

۲.پژوهشکده میگوی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، بوشهر، ایران

**نوع مقاله**
**پژوهشی**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۵
تاریخ پذیرش: : ۱۴۰۱/۱۲/۲۱
تاریخ چاپ الکترونیک: ۱۴۰۱/۱۲/۲۱

***نویسنده مسئول:**

Lalehmosavi84@yahoo.com

**چکیده**

هدف از انجام این مطالعه شناسایی جمعیت‌های مختلف مولدین میگوی سفید غربی پرورشی در مراکز تکثیر استان بوشهر و تعیین شاخص‌های ژنتیکی آن‌ها بر اساس اطلاعات تاریخچه‌ای ذخیره‌های مختلف بود. به این منظور استخراج DNA از بافت عضله ۳۰ قطعه مولد از هر یک از یازده ذخیره مختلف با استفاده از کیت تجاری صورت گرفت. تکثیر توالی‌های تکراری از طریق تکنیک PCR با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر اختصاصی در پژوهشکده میگوی کشور انجام شد. نتایج نشان داد که تعداد آلل‌ها در ذخیره‌های مورد بررسی در دامنه ۵/۵-۴/۵ قرار داشت. بیشترین میزان فراوانی آللی در مولدین پرورشی ذخیره سوم از مرکز تکثیر پارس آبزیان(H2) با میزان ۵/۲±۰/۳۵۹ مشاهده شد. همچنین میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در مولدین پرورشی ذخیره دوم از مرکز تکثیر لیان گستر طلایی (H5) با میزان ۰/۶۶۹±۰/۱۵۲ بیشتر از مولدین سایر مراکز بود. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان شاخص‌های ژنتیکی مولدین پرورشی ذخیره سوم از مرکز تکثیر H2 در مقایسه با سایر ذخیره‌های موجود در مراکز تکثیر استان بوشهر افزایش یافته است. ضریب همخونی در ذخیره‌های اول مولدین مراکز تکثیر زادآوری مند (H3) و دلارام (H1) به ترتیب با میزان ۰/۵۹۵±۰/۱۰۵ و ۰/۵۴۷±۰/۱۴۵ بطور معنی‌داری بیشتر از سایر ذخیره‌ها بود. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان اینگونه عنوان کرد که به منظور افزایش شاخص های ژنتیکی مراکز، باید از مولدین با تنوع ژنتیکی بالاتری استفاده شود.

**کلید واژه‌ها**: تنوع ژنتیکی، ضریب همخونی، فراوانی آللی، میگوی سفید غربی، استان بوشهر

## مقدمه

با توجه به رشد سریع آبزی‌پروری در بیش از دو دهه اخیر مشاهده شد که سهم این صنعت در تولید غذاهای دریائی در جهان، از ۳/۹ درصد وزن کل در سال ۱۹۷۰ به ۲۷/۱ درصد در سال ۲۰۰۰ و ۳۶ درصد در سال ۲۰۰۶ افزایش یافته‌است (Pauly and Zeller, 2017). بررسی داده‌های موجود در جهان حاکی از آن می‌باشد که سطح تولید جهانی میگو در سال ۲۰۲۱ حداقل ۸/۹ درصد بیشتر از سال ۲۰۲۰ بوده است، لیکن پیش‌بینی صورت گرفته برای سال ۲۰۲۲، رشد بیش از ۵ درصدی می‌باشد



[ Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222751.1401.12.3.7.1 ]

(Shen *et al*., 2021). امروزه گونه نخست پرورشی موجود در کشور میگوی سفید غربی (*Penaeus vannamei*) می‌باشد. این گونه اولین بار در سال ۱۳۸۴ توسط پژوهشکده میگوی کشور وابسته به مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور در ایران معرفی شد. با توجه به غیر بومی بودن این گونه در کشور و عدم دسترسی به ذخائر مولدین وحشی و به دلیل مشکلات اقتصادی و بهداشتی موجود در رابطه با واردات موجودات آبزی، تولید و عرضه پست‌لاروهای این گونه در مراکز تکثیر کشور با استفاده از مولدین پرورش داده شده در محیط‌های محصور انجام می‌گیرد. بنابراین از مهم‌ترین معایب محدود کردن جمعیت‌ها در مراکز تکثیر، و از دست رفتن تنوع ژنتیکی در جوامع و انقراض جمعیتی می‌باشد (Busack, 1995 ).

مطالعه بر روی ویژگی‌های ژنتیکی نمونه‌های میگو و تجزیه و تحلیل ارتباطات ژنتیکی بین مولدین می‌تواند ابزار مناسبی برای مدیریت شناسایی ژنتیکی و افتراق‌های ژنتیکی در برنامه‌های پرورشی باشد (Sekin *et al*., 2002; Hillen et *al*., 2017). حفظ تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های میگو مستلزم وجود تنوع ژنتیکی در ذخایر موجود در مراکز تکثیر، الگوهای زیستی مشابه و استفاده از منابع ژنتیکی وحشی و طبیعی می‌باشد (Williams and Johnson, 2013). از جمله روش‌های ژنتیکی مورد استفاده در شناسایی جمعیت‌های مختلف میگوُ روش مولکولی ریزماهواره (Microsatellite) می‌باشد. ریزماهواره‌ها توالی‌های ساده تکرار شونده ۶-۱ نوکلئوتیدی در بخش‌های مختلف DNA هستند که با بررسی آنها، اطلاعات مورد نیاز در رابطه با تفاوت‌های ژنتیکی و جایگاه‌های مختلف بدست می‌آید. با توجه به مطالب فوق می‌توان با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریزماهواره‌ای سطح تنوع ژنتیکی و روابط بین مولدین پرورشی میگوهای سفید غربی موجود در مراکز تکثیر کشور را تعیین نمود. داده‌های بدست آمده می‌توانند در مورد بهترین رویکرد برای تولید ذخایر بنیادی محصور شده با بالاترین میزان تنوع ژنتیکی بمنظور کنترل سطح همخونی جمعیت‌های شناسایی شده در مراکز تکثیر بکار برده شود. بنابراین هدف از این مطالعه شناسایی جمعیت‌های مختلف مولدین میگوی سفید غربی پرورشی در مراکز تکثیر استان بوشهر و تعیین شاخص‌های ژنتیکی آن‌ها بر اساس اطلاعات تاریخچه‌ای ذخیره‌های مختلف بود.

## مواد و روش‌کار

### نمونه گیری و تاریخچه ذخایر مختلف میگوی مورد مطالعه

به منظور دست‌یابی به اطلاعات مربوط به تاریخچه مولدین میگوی سفید غربی (*P .vannamei*) تعداد ذخیره‌های موجود و منشاء مولدین نگهداری شده در مراکز تکثیر دلارام (H1) ، پارس آبزیستان (H2)، زادآوری مند (H3)، هفتم شهریور (H4) و لیان گستر طلایی (H5) واقع در استان بوشهر بدست آمد. تعداد نمونه‌های اخذ شده از هر ذخیره ۳۰ قطعه بود که بعد از نمونه‌گیری بمنظور افزایش ماندگاری تا زمان انجام آزمایشات مولکولی نمونه‌ها در الکل ۷۰ درجه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Machado Tamayo, 2006).

### استخراج و تعیین کیفیت ماده ژنتیکی

استخراج DNA نمونه‌های بافتی از قطعات عضله پای شنا مولدین میگوهای سفید غربی انجام شد. سپس کیفیت ماده ژنتیکی استخراج شده از طریق الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ درصد بررسی شد. به منظور تعیین کمیت از دستگاه اسپکتوفتومتر مدل*A&E* lab در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت $\frac{۲۶۰}{۲۸۰}$ استفاده شد (García-Alegría *et al*., 2020).



[ Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222751.1401.12.3.7.1 ]

### تکثیر توالی‌های ریزماهواره‌ای با پرایمرهای اختصاصی

تکثیر توالی‌های تکراری DNA های نمونه‌های استخراج شده از طریق تکنیک (PCR= polymerase chain reaction) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Corrbet توسط ۱۰ جفت آغازگر اختصاصی پلی مورفیک میگوی سفید غربی ساخته شده توسط شرکت متابیون آلمان به سفارش شرکت پیشگام صورت گرفت (Cruz *et al*., 2002; Freitas *et al*., 2007) (جدول ۱).

**جدول ۱.** توالی نشانگرهای استفاده شده در تکثیر توالی‌های تکراری ریزماهواره‌ای (میکروستلایت) میگوهای سفیدغربی(*P.vannamei*)

| ردیف | پرایمر | توالی (`3→`5) | جفت باز |
|---|---|---|---|
| ۱ | Lvan01 | F: GCCATAAACGCAAGACTGAG<br>R: GCAGGTATACGGTCATGTGTA | ۱۴۶-۱۳۶ |
| ۲ | Lvan07 | F: AAAGAGGAAGATGAGGAAG<br>R: CCTCGGTTACGTATTTATTG | ۲۲۳-۱۸۹ |
| ۳ | Pvan0013 | F: TGCTCTGGTAACGACAAACG<br>R: AGACCTGTGGCGAAGTGC | ۲۸۴-۲۷۶ |
| ۴ | Pvan1758 | F: TATGCTCGTTCCCTTTGCTT<br>R: TTGAAGGAAAAGTGTTGGGG | ۱۸۹-۱۶۳ |
| ۵ | Pvan1815 | F: GATCATTCGCCCCTCTTTTT<br>R: ATCTACGGTTCGAGAGCAGA | ۱۴۱-۱۲۶ |
| ۶ | TUMXLv5.27 | F: CAGACCCTAAATCTCCGTGC<br>R: TGGAAAGGTCAGAGGTCACG | ۱۸۲-۱۶۶ |
| ۷ | TUMXLv5.38 | F: CCTTTATGACTTCCCCCGAC<br>R: CCGTACAGAAACGGAACGTC | ۲۲۲-۲۰۰ |
| ۸ | TUMXLv8.32 | F: TTACCGCCTAAGAGCGAATG<br>R: TGTCCTTTCGTACCAGTCAAG<br>R: CTAACCCAATATCGAATC | ۲۲۸-۲۱۶ |
| ۹ | TUDGLv5-7.33 | F: TGCTAGAATGTCTTTCGAAG<br>R: GTCTGGGGAAATCTTTAATG | ۱۲۶-۱۱۵ |
| ۱۰ | TUDGPv3-5.378 | F: TCGGAAGGTGTCTTTCCAAAC<br>R: AGGAAACCTATCATCGCCGT | ۱۸۶-۱۸۰ |

محصول PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر PCR Buffer، ۱ میکرولیتر $Mg\ Cl_2$، ۰/۷ میکرولیتر d NTP، ۱ میکرولیتر پرایمر پیشرو، ۱ میکرولیتر پرایمر معکوس، ۰/۳ میکرولیتر Taq DNA، ۱۳ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر و ۱ میکرولیتر DNA الگو تهیه شد (Domingues de Freitas and Galetti, 2002). برنامه دمایی جهت تکثیر جایگاه‌ها از طریق PCR به ترتیب شامل واسرشت شدن اولیه (Pre denature) در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، مرحله دوم واسرشت شدن (Denature) در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال به قطعه هدف (Annealing) در درجه حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و بسط (Extraction) در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد 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 صورت پذیرفت.



[ Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222751.1401.12.3.7.1 ]

سپس ۵ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل پلی‌آکریل آمید ۸ درصد همراه با نشانگر استاندارد ۳۰۰۰-۱۰۰ جفت باز (Base pair) به مدت ۲ ساعت ۳۰ دقیقه الکتروفورز و در نهایت رنگ آمیزی با استفاده از نیترات نقره ۱ درصد انجام گرفت (Borrell *et al*., 2003).

## تعیین شاخص‌های ژنتیکی برای ذخایر مختلف میگو

بعد از تعیین جایگاه‌ها بر روی ژل، برای هر کدام از آنها مقادیر فراوانی آلل‌های واقعی (Na) و مؤثر (Ne)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (HO) و قابل انتظار (He)، ماتریکس شباهت و فاصله ژنتیکی (Nei, 1978; Nei and Kumar, 2000)، تعادل هاردی–واینبرگ، تفاوت ژنتیکی ($F_{st}$)، ضریب همخونی (Fis) توسط نرم افزار Gene Alex نسخه ۶ تعیین شد. همچنین درخت موضع شناسی تکاملی بین نمونه‌ها براساس فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم افزار TFPGA و اختلاف بین جمعیت‌ها بر اساس تست ANOVA محاسبه گردید (Peakall and Smouse, 2006). در پایان داده‌های بدست آمده حاصل از ذخائر مختلف از طریق نرم افزار آماری SPSS با استفاده از آزمون t-test و آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) از طریق آزمون Duncan's فراوانی آللی، تمایز ژنتیکی، ضریب همخونی و سایر شاخص‌های در ذخیره‌های مختلف مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

## نتایج

نتایج حاکی از آن بود که تعداد آلل‌های مشاهده شده برای داده‌های غالب در ۱۱ ذخیره مولد بررسی شده در دامنه ۵/۵-۴/۵ آلل قرار داشت. میانگین آلل‌های واقعی مشاهده شده در مولدین پرورشی ذخیره دوم H1 و H5 به ترتیب با میزان ۵/۰±۵۰۰/۶۰۱ و ۴/۵۰۰±۰/۴۵۳ بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد آلل واقعی مشاهده شده نسبت به سایر ذخیره‌ها بود. هیچ‌گونه تفاوت معنی‌دار آماری میان ذخیره‌های فوق با سایر ذخیره‌ها مشاهده نشد ($p>0.05$) (جدول ۲).

**جدول ۲.** فراوانی آلل‌های واقعی و مؤثر در ذخیره‌های مختلف مولدین میگوی سفید غربی مراکز تکثیر مختلف (سال ۱۴۰۰).

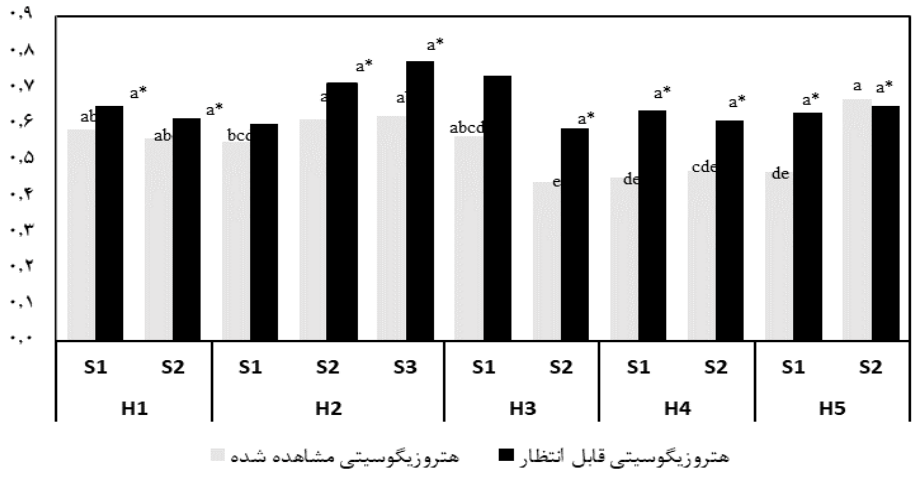
| مرکز تکثیر | ذخیره | تعداد آلل‌های واقعی | تعداد آلل‌های مؤثر |
|---|---|---|---|
| H1 | ۱ | ۴/۰±۸۰۰/۴۶۷$^{a}$ | ۳/۰±۶۴۹/۴۲۳$^{a}$ |
| | ۲ | ۵/۰±۵۰۰/۶۰۱$^{a}$ | ۳/۰±۹۸۹/۵۵۰$^{a}$ |
| H2 | ۱ | ۵/۰±۴۰۰/۵۴۲$^{a}$ | ۴/۰±۰۲۰/۵۲۸$^{a}$ |
| | ۲ | ۴/۰±۹۰۰/۶۷۴$^{a}$ | ۳/۰±۵۹۱/۵۴۳$^{a}$ |
| | ۳ | ۵/۰±۲۰۰/۳۵۹$^{a}$ | ۴/۰±۰۹۳/۲۹۷$^{a}$ |
| H3 | ۱ | ۴/۰±۹۰۰/۵۰۴$^{a}$ | ۳/۰±۷۹۳/۴۲۳$^{a}$ |
| | ۲ | ۵/۰±۲۰۰/۶۱۱$^{a}$ | ۳/۰±۶۴۸/۴۶۶$^{a}$ |
| H4 | ۱ | ۵/۰±۳۰۰/۵۳۹$^{a}$ | ۳/۰±۴۸۸/۴۰۹$^{a}$ |
| | ۲ | ۴/۰±۸۰۰/۵۱۲$^{a}$ | ۳/۰±۴۹۷/۴۲۱$^{a}$ |
| H5 | ۱ | ۴/۰±۹۰۰/۴۵۸$^{a}$ | ۳/۰±۳۲۱/۳۹۱$^{a}$ |
| | ۲ | ۴/۰±۵۰۰/۴۵۳$^{a}$ | ۳/۰±۵۰۸/۴۲۲$^{a}$ |



[ Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222751.1401.12.3.7.1 ]

همچنین با وجود بیش‌تر بودن میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در مولدین پرورشی ذخیره دوم مرکز تکثیر H5 با میزان ۰/۰±۶۶۹/۱۵۲ نسبت به سایر مولدین ذخیره‌های مختلف هیچگونه اختلاف معنی‌دار آماری میان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در این ذخیره با مولدین ذخیره‌های اول و دوم H1، ذخیره‌های اول، دوم و سوم مراکز تکثیر H2 و ذخیره اول مرکز تکثیر H3 مشاهده نشد ($p>0.05$). این در حالی بود که میزان این شاخص در ذخیره دوم مرکز تکثیر H3 با میزان ۰/۰۱۶±۰/۴۳۸ بطور معنی‌داری کمتر از برخی از ذخایر بود ($p<0.05$) (شکل ۱).




**شکل ۱.** مقادیر تنوع ژنتیکی ذخیره‌های مختلف مولدین میگوی سفید غربی مراکز تکثیر مختلف

بررسی میزان ضریب هم‌خونی نشان داد که میزان این شاخص در مولدین ذخیره‌های مختلف افزایش یافته است. با این وجود میزان این شاخص در ذخیره‌های اول مراکز تکثیر H3 و H1 به ترتیب با میزان ۰/۱۰۵ ±۰/۵۹۵ و ۰/۱۴۵ ±۰/۵۴۷ بطور معنی‌داری بیشتر از سایر ذخیره‌ها بود ($p<0.05$). لیکن میزان این شاخص در ذخیره‌های اول و دوم مرکز تکثیر H2 به ترتیب با ۰/۰±۳۵۹/۱۰۷ و ۰/۰۸۵±۰/۳۶۰ میزان بطور معنی‌داری نسبت به سایر ذخیره‌های بررسی شده کمتر بود ($p<0.05$) *(جدول ۳)*.

**جدول ۳**: مقادیر ضریب همخونی در ذخیره‌های مختلف مولدین میگوی سفید غربی مراکز تکثیر مختلف

| مرکز تکثیر | ذخیره | ضریب همخونی |
|---|---|---|
| H1 | ۱ | ۰/۰±۵۴۷/۱۴۵$^{a}$ |
| | ۲ | ۰/۰±۴۲۶/۱۱۳$^{b}$ |
| H2 | ۱ | ۰/۰±۳۶۰/۰۸۵$^{c}$ |
| | ۲ | ۰/۰±۳۵۹/۱۰۷$^{c}$ |
| | ۳ | ۰/۰±۴۲۴/۱۰۸$^{bc}$ |



[ Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222751.1401.12.3.7.1 ]

| مرکز تکثیر | ذخیره | ضریب همخونی |
|---|---|---|
| H3 | ۱ | ۰/۰±۵۹۵/۱۰۵[a] |
| | ۲ | ۰/۰±۴۸۳/۱۱۷[b] |
| H4 | ۱ | ۰/۰±۴۸۶/۰۹۴[b] |
| | ۲ | ۰/۰±۴۹۲/۱۱۲[b] |
| H5 | ۱ | ۰/۰±۴۹۰/۰۹۴[b] |
| | ۲ | ۰/۰±۴۴۹/۱۰۱[b] |

حروف مشترک در هر ستون جدول ۳ نشاندهنده غیر معنی‌دار بودن و حروف غیر مشترک نشاندهنده معنی‌دار بودن می‌باشد.

بررسی تعادل هاردی-واینبرگ به منظور نشان دادن چند شکلی‌ها (Polymorphic) در ذخیره‌های مختلف حاکی از آن بود که تمامی‌جایگاه‌های بررسی شده ذخیره دوم مولدین مرکز تکثیر H2 بطور معنی‌داری منجر به ثبات و فراوانی آلل‌ها شده بودند ($p<0.05, p<0.01, p<0.001$) لیکن در سایر ذخیره‌های نگهداری شده در مراکز تکثیر تنها در چند جایگاه بصورت معنی‌دار مشاهده شدند ($p<0.05, p<0.01, p<0.001$).

همچنین مشاهده شد که بیشترین میزان فاصله ژنتیکی میان مولدین ذخیره سوم مرکز تکثیر H2 با سایر مولدین وجود دارد. این در حالی بود که فاصله ژنتیکی کمی میان مولدین ذخیره‌های اول مراکز تکثیر H4 و H5 وجود داشت (جدول ۴ و شکل ۲).

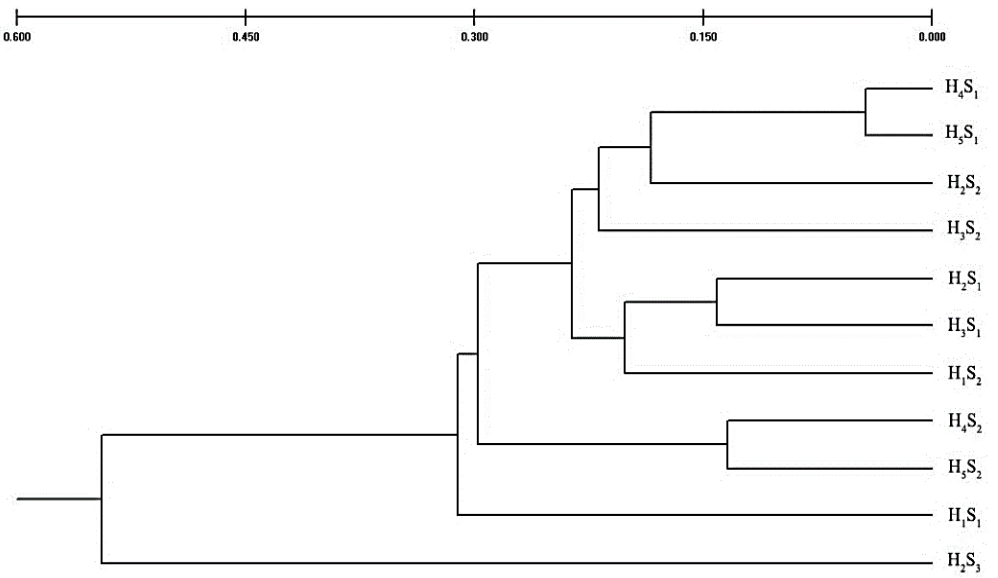
**جدول ۴.** فاصله ژنتیکی مولدین ذخیره‌های مختلف میگوی سفید غربی مراکز تکثیر استان بوشهر (سال ۱۴۰۰).

| H1S1 | H1S2 | H2S1 | H2S2 | H2S3 | H3S1 | H3S2 | H4S1 | H4S2 | H5S1 | H5S2 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.000 | | | | | | | | | | | H1S1 |
| 0.488 | 0.000 | | | | | | | | | | H1S2 |
| 0.406 | 0.257 | 0.000 | | | | | | | | | H2S1 |
| 0.354 | 0.345 | 0.366 | 0.000 | | | | | | | | H2S2 |
| 0.788 | 0.751 | 0.638 | 0.760 | 0.000 | | | | | | | H2S3 |
| 0.346 | 0.325 | 0.242 | 0.321 | 0.533 | 0.000 | | | | | | H3S1 |
| 0.382 | 0.439 | 0.298 | 0.348 | 0.742 | 0.302 | 0.000 | | | | | H3S2 |
| 0.368 | 0.238 | 0.347 | 0.223 | 0.583 | 0.244 | 0.338 | 0.000 | | | | H4S1 |
| 0.379 | 0.398 | 0.395 | 0.424 | 0.573 | 0.483 | 0.467 | 0.381 | 0.000 | | | H4S2 |
| 0.343 | 0.332 | 0.323 | 0.314 | 0.593 | 0.274 | 0.230 | 0.137 | 0.411 | 0.000 | | H5S1 |
| 0.495 | 0.421 | 0.405 | 0.421 | 0.493 | 0.420 | 0.368 | 0.285 | 0.229 | 0.217 | 0.000 | H5S2 |



[ Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222751.1401.12.3.7.1 ]




**شکل ۲.** رابطه فایلوژنتیکی مولدین ذخیره‌های مختلف میگوی سفید غربی در مراکز تکثیر استان بوشهر با بوت استراپ ۱۰۰۰

از سوی دیگر بیش‌ترین میزان شباهت ژنتیکی میان مولدین پرورشی ذخیره اول و دوم مرکز تکثیر H5 و همچنین میان مولدین ذخیره اول مرکز تکثیر H4 با مولدین ذخیره دوم مرکز تکثیر H2 مشاهده شد. با این وجود کم‌ترین شباهت ژنتیکی میان مولدین ذخیره دوم مرکز تکثیر H2 با مولدین ذخیره اول مرکز تکثیر H1 وجود داشت (جدول ۵).

جدول۵. شباهت ژنتیکی مولدین ذخیره‌های مختلف میگوی سفید غربی مراکز تکثیر استان بوشهر (سال ۱۴۰۰).

| H1S1 | H1S2 | H2S1 | H2S2 | H2S3 | H3S1 | H3S2 | H4S1 | H4S2 | H5S1 | H5S2 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.000 | | | | | | | | | | | H1S1 |
| 0.614 | 1.000 | | | | | | | | | | H1S2 |
| 0.666 | 0.773 | 1.000 | | | | | | | | | H2S1 |
| 0.702 | 0.708 | 0.693 | 1.000 | | | | | | | | H2S2 |
| 0.455 | 0.472 | 0.528 | 0.468 | 1.000 | | | | | | | H2S3 |
| 0.708 | 0.723 | 0.785 | 0.725 | 0.587 | 1.000 | | | | | | H3S1 |
| 0.683 | 0.645 | 0.742 | 0.706 | 0.476 | 0.739 | 1.000 | | | | | H3S2 |
| 0.692 | 0.788 | 0.707 | 0.800 | 0.558 | 0.784 | 0.713 | 1.000 | | | | H4S1 |
| 0.685 | 0.671 | 0.674 | 0.655 | 0.564 | 0.617 | 0.627 | 0.683 | 1.000 | | | H4S2 |
| 0.710 | 0.718 | 0.724 | 0.730 | 0.553 | 0.760 | 0.794 | 0.872 | 0.663 | 1.000 | | H5S1 |
| 0.609 | 0.656 | 0.667 | 0.657 | 0.611 | 0.657 | 0.692 | 0.752 | 0.795 | 0.805 | 1.000 | H5S2 |



[ Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222751.1401.12.3.7.1 ]

با این وجود مشاهده شد که بیش‌ترین میزان تمایز ژنی (Fst) میان مولدین ذخیره دوم و سوم مرکز تکثیر H2 با ذخیره دوم مولدین مرکز تکثیر H3 و H1 وجود دارد و کم‌ترین میزان تمایز ژنی میان مولدین ذخیره اول و دوم مرکز تکثیر H5 و همچنین میان مولدین ذخیره اول مرکز تکثیر H4 با مولدین ذخیره دوم H1 مشاهده شد.

**بحث**

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در ذخیره‌های اول مولدین مراکز تکثیر H3 و H1 در مقایسه با سایر مراکز، ضریب همخونی افزایش داشت. در مطالعه‌ای که در مراکز تکثیر چین صورت گرفته بود، میزان ضریب همخونی مولدین بومی شده میگوی سفید غربی ۰/۰۷ محاسبه شد که مقادیر بدست آمده از مراکز تکثیر H3 و H1، با آن مغایرت داشت (Ren *et al*., 2018). با این حال، میزان شاخص‌های ژنتیکی ذخیره‌های سوم مولدین مرکز تکثیر H2 در مقایسه با سایر ذخیره‌های موجود در مراکز تکثیر استان افزایش یافته بود. به دلایل مختلف از جمله عدم دسترسی به مولدین عاری از بیماری خاص بهبود یافته از نظر ژنتیکی، میزان همخونی در مولدین میگوی سفید غربی در مزارع پرورشی در آسیا نسبتاً بالا است. اما مهم‌تر از همه، تعداد محدود میگوهای ماده‌ای که باروری بالایی دارند و می‌توانند چندین بار تخم‌ریزی کنند، به ازدیاد نتایجی که همخونی بالایی با هم دارند، کمک می‌کنند (Ibarra *et al*., 2007; Tan *et al*., 2019؛ Casado *et al*., 2022). این عوامل با هم می‌توانند به طور قابل توجهی خطر همخونی را در یک جمعیت بسته افزایش دهند و علت همخونی زیاد مولدین در این مطالعه می‌تواند ناشی از کاهش تعداد افراد مشارکت کننده و به‌گزینی نادرست آنها باشد. اما در مرکز تکثیر H2 به دلیل نگهداری تعداد زیاد مولدین از ذخیره‌های مختلف علاوه بر افزایش جمعیت پایه، سهم مشارکت افراد در آمیزش برون‌گروهی (Cross-breeding) افزایش یافته بود، از این رو میزان شاخص‌های ژنتیکی در مولدین این ذخایر نسبت به سایر ذخیره‌ها بهبود پیدا کرده بود. همچنین انتخاب‌های درست صورت گرفته در میان مولدین پرورشی باعث شد که شاخص‌های ژنتیکی در این مرکز با کاهش روبرو نگردند (Pazir *et al*., 2021). فاصله کم و شباهت ژنتیکی بالای ذخیره‌های اول مولدین مراکز تکثیر H4 و H5 این مولدین در یک شاخه جداگانه قرارگرفتند. با این وجود بیش‌ترین فاصله ژنتیکی میان مولدین ذخیره سوم مرکز تکثیر H2 با سایر ذخیره‌ها وجود داشت.

با توجه به نتایج این مطالعه مشخص شد که تعداد آلل‌های مشاهده شده و میزان فراوانی آلل‌های اختصاصی در ذخیره‌های مختلف مولدین پرورشی مراکز تکثیر استان بوشهر برای داده های غالب با *دامنه* ۵/۵-۴/۵ آلل در جایگاه‌های مختلف، به شدت کاهش یافته است. Goyard و همکاران (۲۰۰۳) تعداد آلل‌ها در جمعیت‌های وحشی را در دامنه ۲۷ – ۱۴ گزارش کردند، با این وجود عنوان شد که در جمعیت‌های پرورشی به دلیل افزایش آمیزش‌های خویشاوندی و عدم انتخاب درست مولدین در مراکز تکثیر ممکن است بعد از ۴ تا ۷ نسل میزان فراوانی آلل‌ها به شدت کاهش یابد. بنابراین نتیجه این مطالعه در مورد تعداد آلل‌های مشاهده شده با مطالعه پیشین مطابقت دارد. بنابراین با تغییر روش‌های آمیزشی و اجرای برنامه‌های به‌گزینی مناسب در مولدین پرورشی مراکز تکثیر استان بوشهر می‌توان این مشکل را تا حدودی بهبود بخشید. همچنین ذخیره‌های سوم مولدین پرورشی مرکز تکثیر H2، در تعادل هاردی-واینبرگ قرار داشتند. این موضوع می‌تواند به دلیل بکارگیری تعداد بیشتر افراد در تکثیر به عنوان جمعیت پایه و افزایش میزان مشارکت مولدین در ایجاد نسل‌های بعدی باشد. با این حال در ۳ تا ۴ جایگاه مورد بررسی در سایر ذخیره‌های مولدین پرورشی، تعادل بصورت غیر معنی‌دار بود. همچنین نتایج حاکی از آن بود که در ذخیره دوم مولدین مرکز تکثیر H5 ثبات و فراوانی آلل‌ها در ۷ جایگاه بصورت غیر معنی‌دار مشاهده شد. با توجه به اینکه افزایش آلل‌های نول می‌توانند موجب افزایش هموزیگوسیتی و کاهش هتروزیگوسیتی در جمعیت‌ها گردند (Castric *et al*., 2002). در جمعیت‌هایی که دچار تنگناهای ژنتیکی (Bottleneck) می‌شوند، بویژه جمعیت‌هایی که در اسارت و یا در محیط‌های بسته نگهداری شده‌اند و یا مراکزی که دسترسی آن‌ها به منابع وحشی غیر ممکن است این حالت بیش‌تر مشاهده می‌شود (Norris *et al*., 1999). به دلایل مختلف میزان همخونی در مولدین میگوی سفید غربی در مزارع پرورشی در آسیا



[ Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222751.1401.12.3.7.1 ]

نسبتاً بالا است. دلیل عمده این موضوع کمبود مولدین SPF بهبود ژنتیکی یافته است که پرورش‌دهندگان کوچک را مجبور می‌سازد تا بدون اعمال هیچ‌گونه کنترل در سطح همخونی، از والدین نسل دومی استفاده کنند که یا مستقیماً از استخرهای خود و یا از استخرهای محلی دیگر تهیه شده‌اند (Doyle, 2016; Thitamadee *et al*., 2016).

این وضعیت در مولدین پرورشی ذخایر مختلف در مراکز تکثیر استان بوشهر وجود داشت و بنابراین علت انحراف از تعادل هادی – واینبرگ در برخی جایگاه‌های مورد بررسی در این مولدین را می‌توان به این موضوع ارتباط داد.

تنها راه حل واقعی برای خطر همخونی در یک جمعیت بسته این است که مراکز تکثیر میگوی منطقه‌ای برنامه‌های اصلاح نژادی محلی خود را آغاز نمایند. تا از این طریق برنامه های بهتری را طراحی کرده و گونه هایی که بازماندگی و رشد بالاتری دارتد را توسعه پیدا کنند و در عین حال نیازهای بازار داخلی و صادرات میگو را پوشش دهند.

## نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان عنوان نمود که در میان ذخیره‌های مختلف مولدین بررسی شده از مراکز تکثیر استان بوشهر، میزان شاخص‌های ژنتیکی ذخیره‌های سوم مولدین مرکز تکثیر H2 در مقایسه با سایر ذخیره‌های موجود در مراکز تکثیر استان افزایش یافته بود. همچنین انتخاب‌های درست صورت گرفته در میان مولدین پرورشی باعث شده بود که شاخص‌های ژنتیکی با کاهش روبرو نشوند (Pazir *et al*., 2021 ). بنابراین توصیه می‌شود که برای بهبود شاخص‌های ژنتیکی و ممانعت از پسروی ناشی از همخونی علاوه بر به‌گزینی مولدین بر اساس شاخص‌های ژنتیکی از آمیزش‌های برون‌گروهی میان ذخیره‌های مختلف مولدین در مرکز تکثیر بهره برده شود (Ren *et al*., 2020).

## منابع


Borrell, Y., Espinosa, G., Romo, J., Blanco, G., Vázquez, E., Sánchez, J. A. 2003. DNA microsatellite variability and genetic differentiation among natural populations of the Cuban white shrimp Litopenaeus schmitti. Marine Biology. 144(2): 327–333.

Busack, G. 1995. Genetic risks and hazards in hatchery operations: fundamental concept and issues. American Fisheries Society Symposium. 145(15):71–80.

Casado, E., Cabrera, H., Gonz'alez, M. 2022. Genetic diversity and growth-related traits in Penaeus vannamei after ten years without introducing new stocks into Cuba. Aquaculture. 554, 738097.

Castric, V., Bernatchez, L., Belkhir, K., Bonhomme, F. 2002. Heterozygote deficiencies in small lacustrine populations of brook charr Salvelinus Fontinalis Mitchill (Pisces, Salmonidae): a test of alternative hypotheses. Heredity. 89(1): 27–35

Cruz, P., Mejia-Ruiz, C. H., Perez-Enriquez, R., Ibarra, A. M. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp Penaeus (Litopenaeus) vannamei. Molecular Ecology Notes. 2(3): 239–241.

Doyle, R.W. 2016. Inbreeding and disease in tropical shrimp aquaculture: a reappraisal and caution. Aquaculture Research.47(1): 21-35.

Freitas, P D, Calgaro, M. R., Galetti Jr, P. M. 2007. Genetic diversity within and between broodstocks of the white shrimp Litopenaeus vannamei (Decapoda, Penaeidae) and its implication for the gene pool conservation. Brazilian Journal of Biology. 67(4): 939–943.

Freitas, P., Galetti, P. M. 2002. PCR-based VNTR core sequence analysis for inferring genetic diversity in the shrimp Litopenaeus vannamei. Genetics and Molecular Biology. 25(4):431–434.

García-Alegría, A. M., Anduro-Corona, I., Pérez-Martínez, C. J., Corella-Madueño, M. A. G., Rascón-Durán, M. L. 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. 6(9):17-26.




[ Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222751.1401.12.3.7.1 ]

Hillen, JEJ., Coscia, I., Vandeputte, M., Herten, K., Hellemans B, Maroso F. 2017. Estimates of genetic variability and inbreeding in experimentally selected populations of European sea bass. Aquaculture Elsevier. 47(2): 742–749.

Ibarra, A.M., Racotta, I.S., Arcos, F.G., Palacios, E. 2007. Progress on the genetics of reproductive performance in penaeid shrimp. Aquaculture. 268(7): 23-43.

Machado Tamayo, R. 2006. Assessment of genetic variability in two lots of white shrimp, Litopenaeus vannamei (Boone, 1931) introduced to Cuba. International Fisheries Management Department of Aquatic Biosciences Norwegian College of Fishery Science University of Troms. 120p.

Nei, M. 1978. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. Genetics. 89(3): 583–590.

Nei, Masatoshi, Kumar, S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford university press.210p.

Norris, A. T., Bradley, D. G., Cunningham, E. P. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (Salmo salar) populations. Aquaculture. 180(3–4): 247–264.

Pauly, D., Zeller, D. 2017. Comments on FAOs state of world fisheries and aquaculture (SOFIA 2016). Marine Policy. 77(8): 176–181.

Pazir, M.K, Ghasemi, S.A, Mirbakhsh, M. 2021. Genetic characteristics of different generations broodstocks of Litopenaeus vannamei in hatchery centers located on the shores of the Persian Gulf in Bushehr province. Fisheries Science and Technology. 10(2): 213–226. (in Persian).

Peakall, R., Smouse, P. E. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes. 6(1): 288–295.

Ren S, Mather PB, Prentis P, Li Y, Tang B, Hurwood DA. 2020. Quantitative Genetic Assessment of Female Reproductive Traits in a Domesticated Pacific White Shrimp (Penaeus vannamei) Line in China. Scientific Reports 2020 10:1 Nature Publishing Group. 10(1): 1–10.

Ren, S., Mather, P. B., Tang, B., 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(12): 221–231.

Sekin, M., Hara, M., Taniguchi, N. 2002. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder Paralichthys olivaceus. Aquaculture. 213(1–4): 101–122.

Shen, H., Fan, X., Qiao, Y., Jiang, G., Wan, X., Cheng, J., Li, H., Dou, Y., Li, H., Wang, L. 2021. The links among Enterocytozoon hepatopenaei infection, growth retardation and intestinal microbiota in different sized shrimp Penaeus vannamei. Aquaculture Reports. 21(8):88-100.

Tan J, Luan S, Cao B, Luo K, Meng X, 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 Elsevier. 511(2): 73-89.

Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P.V., Sritunyalucksana, K., Flegel, T.W., Itsathitphaisarn, O. 2016. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. Aquaculture. 452(8): 69-87.

Williams Goyard, E., Arnaud, S., Vonau, V., Bishoff, V., Mouchel, O., Pham, D. 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(6): 501–508.

Williams, R., Johnson, P. 2013. Genetic policing: The uses of DNA in police investigations. Willan publication.320p.

[ Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222751.1401.12.3.7.1 ]

Journal of Aquatic Ecology
Volume12, Issue 3, winter 2023
Pages:72-82

Journal of Aquatic Ecology

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

University Of Hormozgan

# Application of microsatellite DNA method in determining genetic diversity of farmed broodstocks of *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) in hatchery centers of Bushehr province

Mohammad Ali Nazari[1], Laleh Mosavi Dehmordi[*1], Mohammad Amini Charmhini[1], Mohammad Khalil Pazir[2]

1. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Behbahan Khatam Alanbia university of technology, Behbehan, Iran

2. Iranian Shrimp Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bushehr, Iran

**Abstract**

The aim of this study was to detect different populations of Pacific White Shrimp *(Penaeus vannamei*: Boone, 1931) in farmed broodstocks and to determine their genetics indeces in hatchery centers of Bushehr province. First, the origin of the farmed broodstocks was determined based on the historical information of the different stocks. Then, DNA was extracted from muscle tissue of 30 broodstocks from 11 different stocks using a commercial kit. The repeated sequences were amplified using 10 specific primers by PCR in Iranian Shrimp Center. The results showed that the number of alleles was in range of 4.5-5.5 in studied stocks. The most allele frequency was observed in the farmed broadstocks of the third stock in H2 hatchery center, 5.2±0/359. Also, the average of observed heterozygosity in the farmed broadstocks of the second stock in H5 hatchery center obtained 0.669±0.152 that was more than other stocks among all centers. The results of the present study showed that genetics indeces of of third stock in H2 hatchery center were increased compared to other stocks in Bucher province. The inbreeding coefficients of the first stocks in H1 (0.595±0.105) and H3 (0.547±0.145) hatchery centers were significantly higher than other stocks. The inbreeding coefficient increase in farmed broadstocks in these stocks could be related to the small size of founder population and the bias selection programs. However, according to the information from other hatchery centers in Bushehr province and other countries, this amount is acceptable. According to the obtained results, it can be concluded that to increase the genetic indicators in the centers, breeders with higher diversity should be used.

**ARTICLE TYPE**
**Research**

Received: 27 July 2022
Accepted: 12 March 2023
ePublished: 12 March 2023

* Corresponding Author:
Lalehmosavi84@yahoo.com

**Keywords:** Genetic diversity, Inbreeding, *Penaeus vannamei*



[ Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222751.1401.12.3.7.1 ]