بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد سوم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۳
http://japu.gau.ac.ir

مطالعه مقایسه‌ای تنوع ژنتیکی در میگوی *Litopenaeus vannamei* با استفاده از جایگشت‌های SSR (مطالعه موردی: بوشهر و گمیشان)

سیوان رضائی[۱]، *حمید فرحمند[۲]، محمدعلی نعمت‌اللهی[۳] و فراز پنجوینی[۴]

[۱]دانش آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه شیلات، دانشگاه تهران، کرج، [۲]دانشیار گروه شیلات، دانشگاه تهران، کرج،
[۳] استادیار گروه شیلات، دانشگاه تهران، کرج، [۴]دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه شیلات، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۲۷

چکیده

با توجه به نبود اطلاعات دودمانی و نسبی مشخص از مولدین وارداتی میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)، در کشور، همچنین نگرانی از کاهش سطح تنوع ژنتیکی و تجمع درون‌آمیزی و به منظور مقایسه شاخص‌های تنوع ژنتیکی و آنالیز تمایز ژنتیکی، مجموع ۳۰ نمونه از تکثیر بوشهر و گمیشان در استان‌های بوشهر و گلستان با سه جایگشت ریزماهواره‌ای TUDGLv5-7.33، TUDGLv7-9.17 و TUDGLv1-3.224، ردیابی شدند. در این مطالعه کاهش ۱۵/۵٤درصد هتروزیگوتی مشاهده شده، افزایش ۱۳/۹۹ درصد درون آمیزی و کاهش ۳۰ درصد تعداد آلل‌ها، در جمعیت گمیشان نسبت به بوشهر، مشاهده شد. نتایج آنالیز جفتی جمعیتی شاخص شانون (sHua)، تنوع معنی‌دار (P<۰/۰۰۱) این دو جمعیت را در دو جایگشت TUDGLv7-9.17 و TUDGLv1-3.224، نشان داد. تعداد ۱٦ و هفت نوع آلل اختصاصی به ترتیب در جمعیت‌های بوشهر و گمیشان وجود داشت. جمعیت بوشهر در جایگشت‌های TUDGLv5-7.33 و TUDGLv1-3.224 (P<۰/۰۱)؛ و جمعیت گمیشان در جایگشت TUDGLv7-9.17 (P<۰/۰۰۱)؛ از تعادل هاردی- واینبرگ (HWE) انحراف داشتند. میانگین بالایی از ضریب درون آمیزی (F_{IS}) در دو جمعیت بوشهر (۰/۳۲۱) و

*مسئول مکاتبه: hfarahmand@ut.ac.ir

گمیشان (۰/۳۸٦) بدست آمد. F_{ST} جفتی جمعیتی ۰/۰۵۷ و مقدار ۰/۰۸٦ برای PhiPT، نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی متوسط، اما قابل توجه در این دو جمعیت می‌باشد. کمتر بودن تعداد آلل‌های اختصاصی در جمعیت گمیشان و در نتیجه تنوع ژنوتیپی پایین‌تر این جمعیت نسبت به جمعیت بوشهر، موید فاصله ژنوتیپی و تمایز قابل توجه این دو جمعیت است. شاخص‌های اصلی کاهش یافته تنوع ژنتیکی و مقادیر F_{IS} بدست آمده، ضرورت دورگه‌گیری در میان هچری‌ها را بویژه در جمعیت گمیشان برجسته می‌سازد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، *Litopenaeus vannamei*، جای‌گشت، بوشهر، گمیشان

مقدمه

مطالعات ژنتیکی به عنوان نخستین گام در اصلاح و بهبود تولید آبزیان (ژنگ و همکاران، ۲۰۰۷)، جهت آگاهی از کیفیت ژنتیکی مولدین میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)، نظیر تنوع ژنتیکی و هتروزیگوتی (پرز انریکوز و همکاران، ۲۰۰۹)، با بررسی ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی، درون‌آمیزی و اندازه موثر جمعیتی، قبل از هرگونه برنامه برای به‌گزینی ضروری است. افزایش درون‌آمیزی و کاهش مداوم تنوع ژنتیکی در طی چندین نسل (اس بی اردنی و همکاران، ۱۹۸٦)، با افزایش احتمال بیان آلل‌های مغلوب مضر در زمان جفت شدن در وضعیت هموزیگوتی (تیو، ۱۹۹۳)، در جمعیت‌های کوچک همراه بوده و ممکن است به کاهش بقا، نرخ رشد و تولید مثل (گجدرم، ۲۰۰۵)، منجر شود. حتی اگر نمونه‌های بنیان‌گذار مولدین از نظر ژنتیکی دست نخورده باشند، فقدان استراتژی مدیریتی مناسب می‌تواند منتهی به درون‌آمیزی و کاهش سریع تنوع در سطح ژن شود. از این نظر شناخت دانش در رابطه با نسب و والدین، جهت تضمین جفت‌گیری در بین افراد غیر خویشاوند (دانگ و همکاران، ۲۰۰٦)، ضروری است. آنالیز شباهت ژنتیکی، اجتناب از درون آمیزی و حفظ تنوع ژنتیکی در عدم وجود اطلاعات رسمی دودمانی و شجره نامه‌ای را ارائه کرده و می‌تواند از ارزش ویژه‌ای در جائیکه اطلاعات دودمانی برای ذخایر فرزندان نسل اول وجود ندارد (دیکسون و همکاران، ۲۰۰۸)، برخوردار باشد. از دیدگاه تئوریک با جایگشت‌های DNA امکان مشاهده و کشف تنوع ژنتیکی در کل ژنوم ممکن است (لیو و کوردس، ۲۰۰٤). جایگشت‌های ریز ماهواره‌ای، به‌عنوان ابزار فوق‌العاده ارزشمند در بررسی تنوع ژنتیکی و ردیابی دودمانی جمعیت‌های هچری (دانگ و همکاران، ۲۰۰٦)، در

نظر گرفته می‌شوند. ریزماهواره‌ها که همچنین به عنوان توالی‌های ساده تکرار شونده[1] شناخته می‌شوند، واحدهای تکراری از یک تا شش نوکلئوتید به صورت متوالی که در ژنوم یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها گسترده شده‌اند (فیلد و ویلس، ۱۹۹۸)، می‌باشند. نحوه توارث همبارز[2] آنها، سطح بالای چند شکلی و سادگی کار باعث می‌گردد که آنها در بسیاری از کاربردها مفید باشند. استفاده از جایگشت‌های ریزماهواره در برنامه اصلاح نژاد، شناسایی اثرهای والدینی را روی عملکردهای نتاج از مراحل اولیه زندگی (دانگ و همکاران، ۲۰۰٦)، میسر می‌سازد. بنابراین می‌توان با بررسی زاده‌ها به برآوردی از وضعیت تنوع ژنتیکی در مولدین پی برد. در این مطالعه نیز از جایگشت‌های ریزماهواره برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در نمونه‌های مورد مطالعه استفاده شده است. با بروز بیماری ویروسی سندرم لکه سفید[3]، تلفات سنگینی در مزارع میگوی پرورشی کشور در سال‌های ۸۱ تا ۸۲ به وقوع پیوست. به منظور ایجاد تنوع گونه‌ای و معرفی گونه مقاوم‌تر، تعداد ۸۰ جفت مولد وانامی در سال ۸۳ از آمریکا وارد شد (افشار نسب و همکاران، ۲۰۰۵). در همین سال موسسه تحقیقات شیلات ایران، در پژوهشکده میگوی کشور، در استان بوشهر، پژوهش روی میگوی وانامی را شروع کرد و در سال ۸٤ به تکنیک تکثیر و پرورش میگوی وانامی دست یافت. در ضمن، تکثیر میگوهای پرورشی نسل سوم مولدین این میگو در دستور کار پژوهشکده میگوی کشور بوده است (پژوهشکده میگوی کشور، ۲۰۰۸). از سوی دیگر، در شهرستان گمیشان استان گلستان، از سال ۸۷ اقدام به مولدسازی از پست لاروهای وانامی وارد شده از استان بوشهر گردیده و در سال ۸۸ پرورش و تکثیر آن با موفقیت انجام شده است (موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ۲۰۱۳). به‌هر حال، در کشور ما با توجه به نبود اطلاعات دودمانی مشخص از مولدین وارداتی این میگو، و نیز مشکلات جدی مرتبط با عدم توجه به شاخص‌های تنوع ژنتیکی در بحث مولد سازی و تکثیر، با در نظر گرفتن تکثیر چند باره از جمعیت‌های بسته مولدین (پرز انریکوز و همکاران، ۲۰۰۸)، بررسی زاده‌های حاصله از تکثیر مولدین میگوی وانامی در استان‌های بوشهر و گلستان، به منظور دستیابی به برآوردی از وضعیت کنونی خزانه ژنتیکی و بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی، با استفاده از جایگشت‌های ژنتیکی شاخص در تنوع ژنتیکی و تعیین نسب میگوی وانامی (گارسیا و آلسیوار وارن، ۲۰۰۷)، انجام شد.

1- SSR
2- Codominant
3- WSSVD

بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، استفاده از جای‌گشت‌های ریزماهواره‌ای به منظور مقایسه تفاوت‌ها در تنوع ژنتیکی، بویژه از دیدگاه تنوع آللی و برآورد وضعیت ژنتیکی مولدین، با بررسی پست لاروها، می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: میگوهای وانامی در مرحله پست لاروی به طور تصادفی در تابستان سال ۹۰ و ۹۱ به ترتیب از مرکز تکثیر میگوی گمیشان در استان گلستان و مجتمع تکثیر و پرورش شیف در استان بوشهر، نمونه‌برداری شدند. پست لاروها بلافاصله در اتانل ۹٦ درجه فیکس شدند (سوزا دلیما و همکاران، ۲۰۰۸) و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه شیلات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انتقال یافتند.

استخراج DNA و تکثیر جایگشت‌های ریزماهواره: DNA ژنومی از ماهیچه و پاهای شنای پست لاروهای نمونه‌برداری شده، با استفاده از کیت استخراج شرکت Bioneer (K-3032 AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit, Republic of Korea) با اندکی تغییر همانند زیر بدست آمد (جدول ۱).

جدول ۱- معرف‌ها (اجزا) مورد استفاده در کیت

معرف	مقدار	دمای نگهداری (°C)	ملاحظات
Proteinase K, lyophilized	۲۵ میلی‌گرم	دمای اتاق (۲۵- ۱۵)	افزودن ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر، نگهداری در ۲۰- درجه سانتیگراد
Tissue Lysis buffer (TL)	۲۵ میلی‌لیتر	دمای اتاق	اختلاط کامل قبل از مصرف
Binding buffer (GC)	۲۵ میلی‌لیتر	دمای اتاق	اختلاط کامل قبل از مصرف
Washing buffer 1 (W1)	٤۰ میلی‌لیتر	دمای اتاق	افزودن ۳۰ میلی‌لیتر از اتانول مطلق
Washing buffer 2 (W2)	۲۰ میلی‌لیتر	دمای اتاق	افزودن ۸۰ میلی‌لیتر اتانول مطلق
Elution buffer (EL)	۳۰ میلی‌لیتر	دمای اتاق	-

سه جایگشت ریزماهواره‌ای توصیف شده (جدول ۲)، برای واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز[1]

1- PCRs

انتخاب شدند (گارسیا و آلسیوار وارن، ۲۰۰۷). تکثیرها در حجم واکنش 25µl محتوی سه مایکرولیتر (۵۰ تا ۱۵۰ نانوگرم) از DNA الگو، یک مایکرولیتر از آغازگرهای forward و reverse، ۱۲/۵ مایکرولیتر از مستر میکس کیت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (2X Taq Master Mix)، شرکت Vivantis (Malaysian Biotechnology Company) و هفت و نیم مایکرولیتر آب مقطر تزریقی انجام شدند. تکثیرهای ریزماهواره در Gene Amp PCR system 9600 thermocycler (USA) با پروتکل بهینه شده (کروز و همکاران، ۲۰۰٤)، در تحت شرایط زیر انجام شدند: ۹٤ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل؛ ۹٤ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، ٥٦-٤٤ درجه سانتی‌گراد (دمای اتصال تدریجی) برای ۱ دقیقه، و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، و مرحله گسترش پایانی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه.

جدول ۲- توصیف سه جایگشت چند شکل ریزماهواره در میگوی وانامی

جایگشت	توالی تکراری	توالی آغازگر (۵′به۳′)	دمای اتصال تدریجی (°C)	محدوده اندازه (جفت باز)	شماره دسترسی در بانک ژن	منبع
TUDGLv 5-7.33	$\ldots(AC)_{11}AT(AC)_{14}\ldots(CA)_3$	F:TGCTAGAATGTCTTTCGAAG R:GTCTGGGGAAATCTTTAATG	۵۶	۱۲۱-۱۸۳	AF006630	گارسیا و آلسیوار وارن، ۲۰۰۷
TUDGLv 7-9.17	$\ldots(T)_{13}N(TA)_4\ldots(AC)_{10}\ldots(AC)_{11}\ldots$	F:ATGGTGAATATAAGGAAGCT R:TGTGATATGGTTTTTGGAG	۵۲	۱۲۵-۱۹۹	AF006631	گارسیا و آلسیوار وارن، ۲۰۰۷
TUDGLv 1-3.224	$\ldots(TAGA)_3\ldots(TAGA)_3\ldots(ACAG)_4$ $\ldots(AG)_{21}A(AG)_{30}\ldots$	F:ACTAGTGGATCTGTCTATTC R:ATACCCACCCATGCATGTTAG	۴۴	۱۶۳-۲۲۵	AF006629	گارسیا و آلسیوار وارن، ۲۰۰۷

آماده‌سازی آگارز متافور برای تفکیک باندهای حاصل از فرآورده‌های PCR: آگارز متافور، آگارز با دمای ذوب متوسط (۷۵ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد که توانایی تفکیک آن دو برابر توانایی تفکیک فرآورده‌های حاصل از آگارز دارای کیفیت عالی، خوب غربال شده می‌باشد. در این پژوهش از ژل ۳ درصد حاصل از پودر متافور شرکت کامبرکس[1] همراه با اتیدیوم بروماید (گرزی بوسکی، ۲۰۱۰)، به منظور تفکیک فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شد.

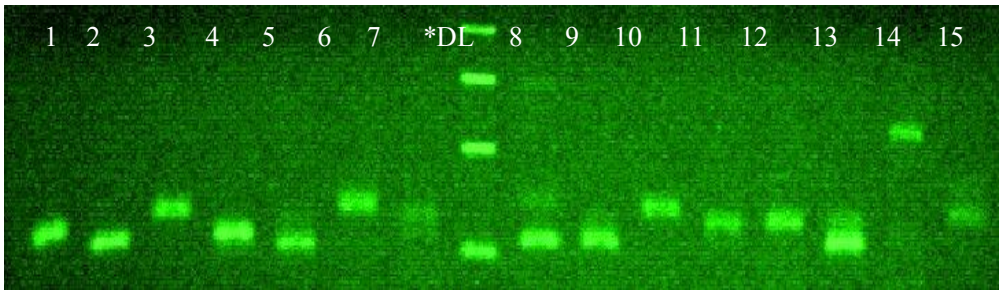
1- CAMBREX

آنالیزهای آماری: محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC[1]) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx 6.41 رایج در علم ژنتیک جمعیت (پیکال و اسموس، ۲۰۰۶)، تجزیه و تحلیل خواهد شد. به این ترتیب که انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ (HWE) ($F_{IS}=0$ یا $F_{IS}\neq0$)، F_{ST}، فراوانی آللی، تعیین هموزیگوتی، هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار و تعداد آلل‌ها برای هر جایگشت محاسبه خواهد شد. همچنین، آماره‌هایی نظیر F_{ST} و F_{IS} برای برآورد میزان جریان ژنی (Nm)، و هم‌خونی، بکار خواهد رفت.

میانگین تعداد آلل‌ها (Na)، میانگین تعداد آلل‌های موثر (Ne)، میانگین هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho)، میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار (He)، شاخص شانون (sHua)، میانگین محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC)، و میانگین شاخص تعادل هاردی- واینبرگ (HWE) در سه جای‌گشت ریزماهواره در دو جمعیت میگوی وانامی، از طریق نرم‌افزار GenAlEx 6.41 رایج در تجزیه و تحلیل علم ژنتیک جمعیت (پیکال و اسموس، ۲۰۰۶)، برآورد شدند. تفاوت‌ها در میان جمعیت‌ها راجع به میانگین تعداد آلل‌ها (Na)، تعداد آلل‌های موثر (Ne)، هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He)، با استفاده از آزمون t مستقل (T-student)، با نرم‌افزار Excel تجزیه و تحلیل شدند. تفاوت‌ها در زمانی‌که $P<0/05$ بود، معنی‌دار در نظر گرفته شدند. در ضمن، فاصله ژنتیکی (D) و ضریب تشابه ژنتیکی (I) در میان جمعیت‌ها، از طریق روش Neis (نی، ۱۹۷۲)، محاسبه شدند.

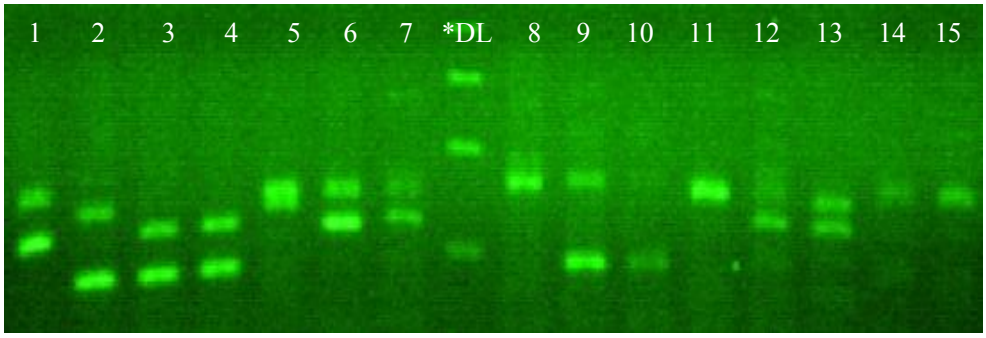
نتایج

باندهای حاصل از فرآورده‌های PCR مربوط به جایگشت‌های سه‌گانه:

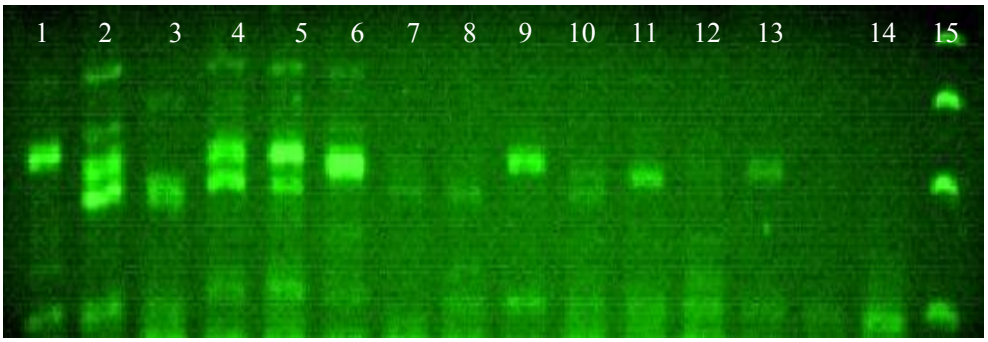


شکل ۱- الگوی الکتروفورز جایگشت TUDGLv5-7.33 (*: DNA Ladder از ۴۰۰-۱۰۰ جفت باز)

1- Polymorphic Information Content



شکل ۲- الگوی الکتروفورز جایگشت TUDGLv7-9.17 (*: DNA Ladder از ٤٠٠-١٠٠ جفت باز).



شکل ۳- الگوی الکتروفورز جایگشت TUDGLv1-3.224 (*: DNA Ladder از ٤٠٠-١٠٠ جفت باز)

تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها: تنوع ژنتیکی دو جمعیت میگوی وانامی با استفاده از سه جایگشت ریزماهواره خاص این گونه در جدول‌های ۳ و ٤ نشان داده شده است. میانگین تعداد آلل‌ها (Na)، و تعداد آلل‌های موثر (Ne) در هر جمعیت در سرتاسر جایگشت‌ها به‌ترتیب محدوده‌ای از ۷ تا ۱۰ و ٥/٢٨٩ تا ٦/٨٩٤ بود. تعداد آلل‌ها در هر جایگشت، در جایگشت TUDGLv7-9.17 با پنج تا ١٤ آلل، به دنبال آن جایگشت‌های TUDGLv5-7.33 و TUDGLv1-3.224 به ترتیب با نه تا ۱۰ و شش تا هفت آلل، بالاتر بود. میانگین هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He)، به ترتیب محدوده‌ای از ٠/٤٨٩ تا ٠/٥٧٩ و ٠/٧٩٦ تا ٠/٨٥٣ بود (جدول ۳).

جدول ۳- تنوع ژنتیکی یافت شده در دو جمعیت از میگوی وانامی در سه جایگشت

جمعیت		جایگشت			میانگین
		TUDGLv5-7.33	TUDGLv7-9.17	TUDGLv1-3.224	
بوشهر	N	۱۵	۱۵	۱۳	۱٤/۳۳۳
	Na	۹	۱٤	۷	۱۰
	Ne	٦/۷۱٦	۸/۰۳٦	۵/۹۳۰	٦/۸۹٤
	I	۲/۰۲٤	۲/۳٦۷	۱/۸۵۲	۲/۰۸۱
	Ho	۰/٤۰۰	۰/۸۰۰	۰/۵۳۸	۰/۵۷۹
	He	۰/۸۵۱	۰/۸۷٦	۰/۸۳۱	۰/۸۵۳
گمیشان	N	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵
	Na	۱۰	۵	٦	۷
	Ne	۷/۵۰۰	۳/۹۱۳	٤/٤۵۵	۵/۲۸۹
	I	۲/۱۳۷	۱/٤٦۸	۱/٦۱۹	۱/۷٤۱
	Ho	۰/٦۰۰	۰/۱۳۳	۰/۷۳۳	۰/٤۸۹
	He	۰/۸٦۷	۰/۷٤٤	۰/۷۷٦	۰/۷۹٦

مقادیر Ho پایین‌تر از مقادیر He بودند، بویژه در جایگشت TUDGLv7-9.17 از جمعیت گمیشان، که نشان‌دهنده نقص کلی انواع هتروزیگوتی برای جایگشت‌های تحت مطالعه می‌باشد (جدول ٤). همچنین شاخص تثبیت (F)، در جایگشت TUDGLv7-9.17 از جمعیت گمیشان، دارای بالاترین مقدار بود، که بازهم نشان‌دهنده خطرات بالای هموزیگوتی در این جایگشت است.

جدول ٤- تعداد وانامی آنالیز شده (N)، هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوتی مورد انتظار (He)، تعداد آلل‌های مشاهده شده در هر جایگشت در دو جمعیت (NOA)، فراوانی شایع‌ترین آلل ((f(MC)، شایع‌ترین آلل (MCA) (جفت باز)، و شاخص تثبیت (F)، برای دو جمعیت وانامی

جمعیت	جایگشت‌های ریزماهواره‌ای	N	Ho	He	NOA	f(MC)	MCA	F
بوشهر	TUDGLv5-7.33	١٥	٠/٤٠٠	٠/٨٥١	٩	٠/٢٣٣	١١٥	٠/٥٣٠
	TUDGLv7-9.17	١٥	٠/٨٠٠	٠/٨٧٦	١٤	٠/٢٦٧	١٥٠	٠/٠٨٦
	TUDGLv1-3.224	١٣	٠/٥٣٨	٠/٨٣١	٧	٠/٢٣١	٢٠٧	٠/٣٥٢
گمیشان	TUDGLv5-7.33	١٥	٠/٦٠٠	٠/٨٦٧	١٠	٠/٢٠٠	١٣٢	٠/٣٠٨
	TUDGLv7-9.17	١٥	٠/١٣٣	٠/٧٤٤	٥	٠/٣٦٧	١٦٢	٠/٨٢١
	TUDGLv1-3.224	١٥	٠/٧٣٣	٠/٧٧٦	٦	٠/٣٣٣	٢١٠	٠/٠٥٤

میانگین شاخص‌های اصلی تنوع ژنتیکی تعداد آلل‌ها (Na)، آلل‌های موثر (Ne)، هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He)، در دو جمعیت بوشهر و گمیشان، معنی‌دار می‌باشد. همچنین شاخص تثبیت، وضعیت بهتر جمعیت بوشهر را از نظر هتروزیگوتی نشان می‌دهد. عدد بدست آمده برای شاخص اطلاعات شانون (I)، بیانگرتنوع بالاتر جمعیت بوشهر است (جدول ٥). همچنین میانگین محتوی PIC در جمعیت‌های بوشهر و گمیشان به‌ترتیب ٠/٨٥ و ٠/٨٠ بدست آمد.

جدول ٥- میانگین تعداد آلل‌ها (Na)، میانگین تعداد آلل‌های موثر (Ne)، میانگین هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho)، میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار (He)، و میانگین شاخص تثبیت (F)، در سه جایگشت ریزماهواره در دو جمعیت میگوی وانامی

جمعیت	Na	Ne	I	Ho	He	F
بوشهر	١٠	٦/٨٩٤	٢/٠٨١	٠/٥٧٩	٠/٨٥٣	٠/٣٢٣
گمیشان	٧	٥/٢٨٩	١/٧٤١	٠/٤٨٩	٠/٧٩٦	٠/٣٩٤
میانگین	٨/٥	٦/٠٩٢	١/٩١١	٠/٥٣٤	٠/٨٢٥	٠/٣٥٩

نتایج آنالیز جفتی جمعیتی برای شاخص‌های شانون (sHua) و ضریب جریان ژنی (Nm)، که به ترتیب شاخص‌هایی از تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی می‌باشند، به استثنای جایگشت TUDGLv5-7.33، در دو جایگشت دیگر در احتمال P<٠/٠٠١، معنی‌دار است (جدول ٦).

جدول ٦- نتایج آنالیز جفتی[1] جمعیتی شاخص شانون و ضریب جریان ژنی (Nm) برای داده‌های همبارز در هر جایگشت

جمعیت	جای‌گشت	sHua	Nm	احتمال (P)	معنی‌داری
بوشهر- گمیشان	TUDGLv5-7.33	۰/۱٥٦	۰/۹۹۸	۰/۲۹٤	ns
بوشهر- گمیشان	TUDGLv7-9.17	۰/٦۲٦	۰/۰٦۲	۰/۰۰۰	***
بوشهر- گمیشان	TUDGLv1-3.224	۰/٥٦۳	۰/۰۷۷	۰/۰۰۰	***

***: P<۰/۰۰۱

در جمعیت‌های بوشهر و گمیشان به‌ترتیب ۲۲ و ۱۸ نوع آلل بدست آمد. جمعیت‌های بوشهر و گمیشان در جایگشت TUDGLv7-9.17 با ١٤ و پنج نوع آلل، به ترتیب بیشترین و کمترین میزان آلل‌ها را به خود اختصاص دادند. تعداد ١٦ و هفت نوع آلل اختصاصی به ترتیب در جمعیت‌های بوشهر و گمیشان وجود داشت. حدود اندازه آللی در جمعیت‌های بوشهر و گمیشان، در سرتاسر سه جایگشت بررسی شده، به‌ترتیب در محدوده ۸۸ تا ۲۲۰ و ۱۰۵ تا ۲۲۰ جفت باز بدست آمد.

با ملاحظه تعداد آلل‌های مشاهده شده در سرتاسر جایگشت‌ها، در مجموع ٣٤ و ۲۸ نوع ژنوتیپ، به ترتیب در جمعیت‌های بوشهر و گمیشان یافت شد، که در این میان جایگشت‌های TUDGLv7-9.17 و TUDGLv5-7.33، به ترتیب در جمعیت‌های بوشهر و گمیشان، با ۱۳ و ۱۲ نوع ژنوتیپ بیشترین و جایگشت TUDGLv7-9.17، جمعیت گمیشان، با هفت نوع ژنوتیپ، کمترین تنوع ژنوتیپی داشتند. ژنوتیپ‌های KK و MM در جایگشت TUDGLv7-9.17 ، AH و CC در جایگشت TUDGLv1-3.224 جمعیت گمیشان بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند.

جمعیت بوشهر در جایگشت‌های TUDGLv5-7.33 و TUDGLv1-3.224 (P<۰/۰۱)؛ و جمعیت گمیشان در جایگشت TUDGLv7-9.17 (P<۰/۰۰۱)؛ از تعادل هاردی- واینبرگ انحراف داشتند (جدول ۷).

1- Pairwise

جدول ۷- خلاصه آزمون‌های مربع کای برای تعادل هاردی- واینبرگ (HWS)

جمعیت	جایگشت	درجه آزادی	مربع کای	احتمال (P)	معنی‌داری
	TUDGLv5-7.33	۳٦	٦٧/١٣٦	۰/۰۰۱	**
بوشهر	TUDGLv7-9.17	۹۱	١٠٩/٣٧٥	۰/۰۹۲	ns
	TUDGLv1-3.224	۲۱	٤٠/٦٦١	۰/۰۰٦	**
	TUDGLv5-7.33	٤٥	٥١/٤١٧	۰/۲۳۷	ns
گمیشان	TUDGLv7-9.17	۱۰	٤٦/٥٢٥	۰/۰۰۰	***
	TUDGLv1-3.224	۱٥	١٧/٩٣٤	۰/۲٦٦	ns

ns: غیر معنی‌دار؛ ** P< ۰/۰۱؛ *** P< ۰/۰۰۱

در جایگشت‌های TUDGLv5-7.33، آلل‌های نوع ۲۲ام (V) و ۱۸ام (R)، به‌ترتیب با فراوانی ۰/۲۳۳ و ۰/۲۰۰، TUDGLv7-9.17، آلل‌های نوع ۱۱ام (K)، با فراوانی ۰/۳٦۷، ۱۳ام (M)، و ١٤ام (N)، با فراوانی ۰/۲٦۷، و در جایگشت TUDGLv1-3.224، به‌ترتیب آلل‌های نوع سوم (C) (۰/۳۳۳)، نوع اول (A) (۰/۲۳۳)، نوع چهارم (D) (۰/۲۳۱)، و نوع هشتم (H) (۰/۲۰۰)، بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. دو جمعیت آنالیز شده مجموع ارزش‌های مثبت را در طی برآورد آزمون F_{IS} نشان داد (جدول ۸). میانگین مقدار F_{IS}، در جمعیت گمیشان نسبت به جمعیت بوشهر بیشتر بود.

جدول ۸- مقدار F_{IS} برآورد شده برای دو جمعیت وانامی

جایگشت	جمعیت		میانگین
	بوشهر	گمیشان	
کل	۰/۳۲۱	۰/۳۸٦	۰/۳٥٤

مقادیر F_{ST} جفتی برآورد شده، تمایز ژنتیکی متوسط و قابل توجه‌ای را در بین دو جمعیت مطالعه شده نشان داد. این موضوع را می‌توان از مقدار Nm جفتی بدست آمده، دریافت (جدول ۹).

جدول ۹- برآوردهای F_{ST} جفتی و Nm جفتی در بین دو جمعیت وانامی

جمعیت	بوشهر	گمیشان	جمعیت
بوشهر	۰/۰۰۰	٤/١٥٦	بوشهر
گمیشان	۰/۰٥۷	۰/۰۰۰	گمیشان

مقادیر F_{ST} و Nm جفتی به‌ترتیب در زیر و بالای قطر قرار دارند.

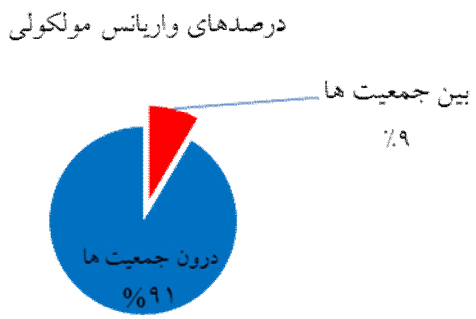
ضریب تشابه ژنتیکی بین دو جمعیت؛ بوشهر- گمیشان، ۰/٤٤١، و فاصله ژنتیکی بین این دو جمعیت، ۰/۸۲۰، بود (جدول ۱۰). مشخص است که هرچه میزان همانندی[1] ژنتیکی کمتر باشد، فاصله ژنتیکی بیشتر خواهد بود.

جدول ۱۰- همانندی ژنتیکی Neis (I) و فاصله ژنتیکی (D) در دو جمعیت وانامی

جمعیت	بوشهر	گمیشان	جمعیت
بوشهر	۱/۰۰۰	۰/۸۲۰	بوشهر
گمیشان	۰/٤٤١	۱/۰۰۰	گمیشان

مقادیر مربوط به تشابه ژنتیکی و فاصله ژنتیکی به ترتیب در زیر و بالای قطر نشان داده شده‌اند.

آنالیز واریانس مولکولی: دو جمعیت مطالعه شده به ترتیب دارای تنوع مولکولی درون و بین جمعیتی زیاد و کم می‌باشند (شکل ٤).



شکل ٤- واریانس مولکولی درون و بین جمعیت‌ها برحسب درصد

آماره PhiPT و ضریب جریان ژنی (Nm) محاسبه شده از طریق برآورد واریانس مولکولی، با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx 6.41، به‌ترتیب نشان داد که تمایز ژنتیکی متوسط و قابل توجه‌ای از دیدگاه ژنوتیپی و جریان ژنی به نسبت کافی بین جمعیت‌های بررسی شده وجود دارد (جدول ۱۱).

1- Identity

جدول ۱۱- آماره PhiPT نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی

آماره	مقدار	P(rand>=data)
PhiPT	۰/۰۸٦	۰/۰۱۰
Nm	۲/٦٥۲	

بحث

جایگشت‌های سه گانه توسعه یافته برای این میگو، از مرور منابع انتخاب شدند (گارسیا و آلسیوار وارن، ۲۰۰۷). پرز انریکوز و همکاران (۲۰۰۹)، کاهش ۲۰ درصد هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho) را در پنج تا شش نسل ملاحظه کردند، که معادل افزایش ۱۸ درصد درون آمیزی است. در این مطالعه کاهش ۱۵/٥٤ درصد هتروزیگوتی مشاهده شده (۰/٥۷۹ به ۰/٤۸۹)، در جمعیت بوشهر- گمیشان مشاهده شد، که نشان‌دهنده، افزایش ۱۳/۹۹ درصد درون آمیزی در جمعیت گمیشان است (پرز انریکوز و همکاران، ۲۰۰۹). در این مطالعه، میانگین تعداد آلل‌ها ۷ تا ۱۰، مشابه با کروز و همکاران (۲۰۰٤)، بدست آمد. از جنبه تعداد آلل‌ها؛ به عنوان شاخص اصلی تنوع ژنتیکی، کاهش ۳۰ درصد تعداد آلل‌ها از جمعیت بوشهر (۱۰) به جمعیت گمیشان (۷) مشاهده شد (پرز انریکوز و همکاران، ۲۰۰۹). این کاهش می‌تواند موید اندازه موثر جمعیتی کوچک جمعیت گمیشان باشد. بالا بودن میانگین شاخص تثبیت (F) که نشان‌دهنده افزایش تثبیت آللی و کاهش هتروزیگوتی است را می‌توان از تفاوت قابل توجه در میانگین Ho (۰/٥۳٤) نسبت به He (۰/۸۲٥) که معادل کاهش ۳٥/۲۷ درصد سطوح هتروزیگوتی از دیدگاه جمعیتی، بویژه در جمعیت گمیشان با تفاوت ٦ درصد نسبت به جمعیت بوشهر می‌باشد، دریافت، که می‌تواند به اثر شدید bottleneck در جمعیت بنیان‌گذار نسبت داده شود (ماکادو تامایو، ۲۰۰٦).همچنین میانگین هتروزیگوتی این دو جمعیت، از دیدگاه هتروزیگوتی مورد انتظار کل در هر جایگشت، بالاتر از ۰/٥ (۰/۸۸-۰/۸۷) است، که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی غنی دو جمعیت بررسی شده از دیدگاه تنوع آللی است (ژی من و همکاران، ۲۰۱۰). ولی باید به این نکته توجه داشت که در یک bottleneck کوتاه‌مدت، کاهش شدیدی در تعداد آلل‌ها بدون داشتن اثر زیاد بر روی هتروزیگوتی می‌تواند رخ دهد (ماکادو تامایو، ۲۰۰٦). میانگین PIC بدست آمده، بر مبنای فراوانی آللی، ۰/۸٥ و ۰/۸۰ به ترتیب در جمعیت‌های بوشهر و گمیشان، علاوه بر تایید فراوانی و تعداد بیشتر آلل‌ها در جمعیت بوشهر، نشان‌دهنده به شدت چند شکل بودن جایگشت‌های

مورد مطالعه است، که می‌تواند بیان کننده کافی بودن تعداد والدین شرکت کننده در تشکیل نسل بعد باشد؛ بدین مفهوم که با وجود انتخاب، تنوع ژنتیکی از دیدگاه تنوع آللی در سطح واریته‌های اصلی حفظ شده است (ژی من و همکاران، ۲۰۱۰). در گونه‌های گرمسیری همچون میگوی وانامی، جریان ژنی (Nm)، بالاتر از یک، نشان‌دهنده یکنواخت بودن فراوانی آللی و عدم ناجورشدگی[1] ژنتیک جمعیت است. در جمعیت‌های جفتی بوشهر- گمیشان، جز در جایگشت TUDGLv5-7.33، به دلیل ناکافی بودن جریان ژنی، در شاخص شانون که بر مبنای فراوانی آللی است، تفاوت معنی‌دار و قابل توجه‌ای دیده می‌شود. این موضوع را می‌توان از تفاوت فراوانی آللی و تعداد آلل‌ها دریافت، که در دو جایگشت دیگر معنی‌دار است (اولیویرا و همکاران، ۲۰۰٦). محدوده اندازه آللی در سه جایگشت، به‌ویژه در جمعیت بوشهر، نشان‌دهنده سطح بالایی از تنوع آللی با وجود تکثیر در اسارت است. تفاوت اندازه آللی، به ترتیب در جمعیت‌های بوشهر و گمیشان، محدوده‌ای از ٤٥ تا ۱۰۹و ۵۰ تا ۵۷ جفت باز، بدست آمد. گارسیا و آلسیوار وارن (۲۰۰۷)، در میگوی پرورشی ۳۲ تا ٧٤جفت باز و در میگوی وحشی ۷۷ تا ۱۸۰جفت باز مشاهده کردند. تفاوت‌های بزرگتر مشاهده شده در محدوده اندازه آللی؛ می‌تواند به وجود آلل‌های خنثی یا جهش‌ها نسبت داده شود (گارسیا و آلسیوار وارن، ۲۰۰۷). ماکادو تامایو (۲۰۰٦) بیان داشت که؛ نقص هتروزیگوتی، منجر به انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ می‌شود. در این مطالعه، در جمعیت‌های بوشهر و گمیشان، به ترتیب دو و یک جایگشت، از تعادل هاردی- واینبرگ انحراف داشتند. در جایگشت‌هایی که انحراف از تعادل مشاهده می‌شود، ما کمبود Ho را نسبت به He داریم. در جایگشت‌های TUDGLv5-7.33؛ Ho: 0.400 و He: 0.851؛ و TUDGLv1-3.224؛ Ho: 0.538 و He: 0.831؛ در جمعیت بوشهر، و در جایگشت TUDGLv7-9.17؛ Ho: 0.133 و He: 0.744؛ استفاده شده در جمعیت گمیشان، چنین کمبودی مشاهده شد. تعداد اندک ژنوتیپ‌ها در جایگشت TUDGLv7-9.17 جمعیت گمیشان، موید این انحراف معنی‌دار از تعادل هاردی- وینبرگ است. در جایگشت‌های TUDGLv5-7.33، و TUDGLv7-9.17 جمعیت بوشهر به ترتیب دو، و هشت آلل، و در جایگشت TUDGLv5-7.33 جمعیت گمیشان دو آلل با فراوانی اندک (۰/۰٤-۰/۰۱)، مشاهده شدند. فراوانی بعضی از آلل‌ها، در هر دو جمعیت برابر با صفر (۰/۰۰۰) است، در نتیجه خطرهای بالای هموزیگوتی محتمل است (گارسیا و آلسیوار وارن، ۲۰۰۷).

1- Heterogeneity

در مطالعه ما، میانگین ضریب درون‌آمیزی (F_{IS}) بالای بدست آمده، در بین دو جمعیت بوشهر (۰/۳۲۱) و گمیشان (۰/۳۸٦)، به این معنی است که کاهش‌های کاملی از هتروزیگوتی بویژه در جمعیت گمیشان وجود دارد. این موضوع را می‌توان بویژه در جایگشت TUDGLv7-9.17 از جمعیت گمیشان به سبب پایین بودن مقدار هتروزیگوتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوتی مورد انتظار، دید. بیشتر بودن مقدار شاخص تثبیت (F)، در جمعیت گمیشان، نشان‌دهنده کمبود هتروزیگوتی (He > Ho) و احتمال هموزیگوتی بالاتر در این جمعیت است (سوزا د لیما و همکاران، ۲۰۰۸). از طرف دیگر، بالا بودن ضریب درون‌آمیزی، بویژه در جمعیت گمیشان را می‌توان با در نظر گرفتن Ne که شاخص کامل‌تری از Na در جمعیت‌های بسته در هچری‌ها می‌باشد (تانیگوچی، ۲۰۰۳)، توجیه کرد. زیرا هر چقدر تعداد آلل‌های موثر کمتر باشد، هموزیگوتی مورد انتظار بیشتر و در نتیجه ضریب درون‌آمیزی بالاتر است (ماکادو تامایو، ۲۰۰٦). انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ به سبب کسر و کمبود هتروزیگوتی، نشان داده شده توسط ضریب درون آمیزی، می‌باشد. اثر وهلوند [1]، یعنی تقسیم شدن جمعیت محلی به واحدهای تولید مثلی مجزا و متمایز، منجر به فقدان هتروزیگوتی می‌شود (ماکادو تامایو، ۲۰۰٦). پنائیدها می‌توانند درون‌آمیزی ۲۸ درصد، و ۳۲ درصد تا ۸۰ درصد را تحمل کنند. مطالعات توصیه کردند که درون‌آمیزی نباید از ۱۰ درصد بالا رود (پرز انریکوز و همکاران، ۲۰۰۹). به هر حال، ضرایب درون آمیزی بدست آمده در مطالعه ما، با وجود برآورد بیش از حد، بسیار بالاتر از مقادیر ضریب درون‌آمیزی ۱ و ۲ درصد توصیه شده توسط FAO به ترتیب برای برنامه‌های مدیریت کوتاه و طولانی مدت مولدین (پرز انریکوز و همکاران، ۲۰۰۹)، می‌باشند. از دیدگاه ضریب تمایز ژنتیکی (F_{ST})؛ مقدار ۰/۰۵-۰ برای این شاخص، تمایز ضعیف؛ ۰/۱۵-۰/۰۵، تمایز متوسط؛ ۰/۲۵-۰/۱۵، تمایز وسیع؛ و بیشتر از ۰/۲۵ به معنی تمایز به شدت وسیع و زیاد است (ژی من و همکاران، ۲۰۱۰). F_{ST} جفتی جمعیتی در مطالعه ما؛ ۰/۰۵۷، نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی متوسط ولی قابل توجه (پرز انریکوز و همکاران، ۲۰۰۹) در بین دو جمعیت مطالعه شده است. از طرف دیگر، آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA)، مقدار ۰/۰۸٦ را برای PhiPT، از دیدگاه فاصله ژنوتیپی برآورد کرد، که بازهم نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی متوسط، اما قابل توجه در این دو جمعیت می‌باشد (ژی‌من و همکاران، ۲۰۱۰). کم بودن تعداد آلل‌های اختصاصی در جمعیت گمیشان و در

1 - Wahlund effect

نتیجه تنوع ژنوتیپی پایین‌تر این جمعیت نسبت به جمعیت بوشهر، موید فاصله ژنوتیپی و تمایز قابل توجه این دو جمعیت است. از جنبه مقایسه‌ای، نسل اول میگوی وانامی در کوبا، با کاهش در شاخص‌های اصلی تنوع ژنتیکی مواجه بوده است (ماکادو تامایو، ۲۰۰٦). در بررسی سه نسل متوالی از مولدین پرورشی میگوی وانامی در برزیل (سوزا د لیما و همکاران، ۲۰۰۸) تنوع ژنتیکی حفظ شده بود، که به اندازه موثر جمعیتی بزرگ و تنوع ژنتیکی بالای ذخیره بنیان گذار اصلی نسبت داده شد. در بررسی جمعیت‌های هچری این میگو در مکزیک (پرز انریکوز و همکاران، ۲۰۰۹)، نشان داده شد که تنوع ژنتیکی جمعیت‌های پرورشی از کاهش در تعداد آلل‌ها رنج می‌برد. این مورد به وقوع bottleneck در برخی از نسل‌ها قبل از ورود ذخایر پست لاوری میگوی وانامی به مکزیک نسبت داده شد. در جمع‌بندی نهایی، شاخص‌های PIC و شانون، وضعیت آللی خوبی را بویژه در جمعیت بوشهر ارائه می‌کنند. مطالعه ما نشان داد که از جنبه شاخص‌های اصلی تنوع ژنتیکی، تفاوت قابل توجه و معنی‌داری در بین دو جمعیت وجود دارد و جمعیت گمیشان با کاهش در این شاخص‌ها مواجه است. کاهش در شاخص‌ها می‌تواند ناشی از اندازه موثر جمعیتی کوچک جمعیت وارد شده از بوشهر به گمیشان باشد، که نماینده همه جمعیت اصلی نبوده و به بیان دیگر زیر جمعیتی از جمعیت اصلی بوده و می‌توان گفت که ممکن است یک نوع bottleneck رخ داده باشد. تمایز ژنتیکی جفتی متوسط ولی قابل توجه‌ای در بین این دو جمعیت یافت شد، این تفاوت به سبب کم بودن هتروزیگوتی مشاهده شده نسبت به مورد انتظار و بالطبع انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ بود. مقادیر F_{IS} بالای مشاهده شده در مطالعه ما (حتی اگر بیش از حد برآورد شده باشند) نشان‌دهنده این نیست که تولید لارو هچری‌ها از کیفیت پایینی برخوردار خواهد بود، بلکه ترجیحاً و نسبتاً نشان‌دهنده این است که خطر کاهش عملکرد به سبب پسروی ناشی از درون‌آمیزی در نسل بعد، بویژه در زمانیکه مبنای انتخاب برای ایجاد مولدین فقط فنوتیپ مطلوب و مد نظر باشد، احتمال بیشتری برای رخ دادن دارد. مقادیر F_{IS} بدست آمده احتمالاً می‌تواند به سبب اثرهای رانش ژنتیکی، درون آمیزی و انتخاب باشد. کاهش شاخص‌های اصلی تنوع ژنتیکی و درون‌آمیزی کلی ۳۵/٤ درصد، ضرورت دورگه‌گیری در میان هچری‌ها را بویژه در جمعیت گمیشان برجسته می‌سازد.

منابع

1. Afsharnasab, M., and Dashtiannasab, A., and Yeganeh, V. 2005. Assessing pathogenesis of the White Spot Syndrome Virus (WSSV) in the whiteleged shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Iranian scientific fisheries journal, spring 16(1): 1-8. (In Persian).
2. Cruz, P., and Ibarra, A.M., and Mejia-Ruiz, H., and 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.
3. Dixon, T.J., and Coman, G.J., and Arnold, S.J., and Sellars, M.J., and Lyons, R.E., and Dierens, L., and Preston, N.P., and Li, Y. 2008. Shifts in genetic diversity during domestication of black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, monitored using two multiplexed microsatellite systems. Aquaculture. 283: 1-6.
4. Dong, S., and Kong, J., and Zhang, T., and Meng, X., and Wang, R. 2006. Parentage determination of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) based on microsatellite DNA markers. Aquaculture. 258: 283-288.
5. Field, D., and Wills, C. 1998. Long polymorphic microsatellites in simple organisms. Proceeding of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences. 263: 209-215.
6. Garcia, D.K., and Alcivar-Waren, A. 2007. Charactrization of 35 new microsatellite genetic markers for the pacific white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: their usefulness for studying genetic diversity of wild and cultured stocks, tracing pedigree in breeding programs, and linkage mapping. Journal of Shellfish Research. 26(4): 1203-1216.
7. Gjedrem, T. 2005. Selection and Breeding Programs in Aquaculture. Springer, Dordrecht. 364p.
8. Grzybowski, M. 2010. Genetic variation of 17 wild yellow perch populations from the Midwest and east coast analyzed via microsatellites. Transition of the American Fisheries Society. 139: 270-287.
9. IFRO. 2013. Rendermodule. Available from http://giwasrc.ifro.ir/rendermodule.aspx. Accessed 19th November 2013. (In Persian).
10. Liu, Z.J., and Cordes, J.F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture. 238: 1-37.
11. Luvesuto, E., and Domingues de Freitas, P., and Galetti Junior, P.M. 2007. Genetic variation in a closed line of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). Genetics and Molecular Biology. 30(4): 1156-1160.
12. Machado-Tamayo, R.J. 2006. Assessment of genetic variability in two lots of White shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) introduced to Cuba. Master in Science Thesis. Norwegian College of Fishery Science, University of Tromsø, Norway. 48p.

13. National shrimp research institute, spring. 2008. Overview of shrimp culture in Iran and world, Pp: 1-15.
14. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist. 106:283-292.
15. Norris, A.T., and Bradley, D.G., and Cunningham, E.P. 2000. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. Aquaculture. 182: 73-83.
16. Oliveira, E.J., and Padua, J.G., and Zucchi, M.I., and Vencovsky, R., and Carneiro Vieira, M.L. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics and Molecular Biology. 29(2): 294-307.
17. Peakall, R., and Smouse, P.E. 2006. GenAlEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes. 6: 288-295.
18. Perez-Enriquez, R., and Hernandez-Martinez, F., and Cruz, P. 2009. Genetic diversity status of White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* broodstock in Mexico. Aquaculture. 297: 44-50.
19. Sbordoni, V., and De Matthaeis, E., and Sbordoni, M.C., and La Rasa, G., and Mattoccia, M. 1986. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). Aquaculture. 57: 239-251.
20. Souza de Lima, A.P., and Lira dos Santos, A.C., and Dantas, H.L., and Gomes Filho, M.A., and Maggioni, R., and Moura Coimbra, M.R. 2008. Genetic monitoring of broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* in a closed rearing system in Pernambuco, Brazil. Aquaculture Research. 39: 1461-1466.
21. Taniguchi, N. 2003. Genetic factors in broodstock management for seed production. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 13: 177-185.
22. Tave, D. 1993. Genetics for fish hatchery managers, 2nd ed. Van Nostr and-Reinhold, New York. 415p.
23. Zhang, L., and Yang, C., and Zhang, Y., and Li, L., and Zhang, X., and Zhang, Q., and Xiang, J. 2007. A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rates. Genetica. 131: 37-49.
24. Zhi-min, L., and Li, X., and Fu-liang, Y., and Guo-liang, C. 2010. SSR analysis of three species from primary parent and their first generation of *Litopenaeus vannamei*. Agricultural Biotechnology. 11(3): 57-61.