

بررسی تنوع ژنتیکی در میگوی *Litopenaeus vannamei* با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی SSR در بندر جاسک استان هرمزگان

- ❖ سیوان رضائی: دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- ❖ حمید فرحمند*: دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- ❖ محمدعلی نعمت‌اللهی: استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

با توجه به نبود اطلاعات دودمانی و نسبی مشخص از مولدین وارداتی میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) در کشور، وضعیت ساختار ژنتیکی و تنوع ژنتیکی این گونه مشخص نیست. به منظور برآورد وضعیت کنونی خزانه ژنتیکی و بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی، مجموع ۳۰ نمونه از دو مزرعه امیری و گورگیج در بندر جاسک استان هرمزگان با چهار نشانگر ریزماهواره‌ای Pvan1758، TUDGLv1-3.224، TUDGLv5-7.33، و TUDGLv7-9.17 ردیابی شدند. تعداد آلل‌ها در هر نشانگر ۵ تا ۱۰ آلل بود. میانگین تعداد آلل‌ها (Na) از نظر جمعیتی، محدوده‌ای از ۷/۵ تا ۷/۷۵ و تعداد مؤثر آنها (Ne) از ۴/۸۳۴ تا ۵/۱۴۸ بود. میانگین مقدار هتروزیگوتی مشاهده‌شده (Ho) از نظر جمعیتی، محدوده‌ای از ۰/۴۵۸ تا ۰/۴۷۹ بود که کمتر از مقدار هتروزیگوتی مورد انتظار (۰/۷۹۱) تا ۰/۷۹۴ بود. همچنین، مقادیر هتروزیگوتی مشاهده‌شده (Ho) پایین‌تر از مقادیر هتروزیگوتی مورد انتظار (He) بودند، به جز برای TUDGLv1-3.224 در جمعیت گورگیج، که نقص کلی انواع هتروزیگوتی را برای نشانگرهای تحت مطالعه نشان می‌دهد. میانگین محتوی اطلاعات چندشکل (PIC) در دو جمعیت از نظر نشانگری (۰/۸۸) نشان‌دهنده به‌شدت چندشکل بودن نشانگرهای مورد مطالعه است. جمعیت مزرعه امیری در نشانگرهای TUDGLv5-7.33 و Pvan1758 ($P < 0.001$) و جمعیت مزرعه گورگیج در نشانگرهای TUDGLv5-7.33 ($P < 0.01$)، TUDGLv7-9.17 و Pvan1758 ($P < 0.001$) از تعادل هاردی-واینبرگ (HWE) انحراف داشتند. میانگین ضریب درون‌آمیزی (FIS) ۰/۴۱، و ضریب تمایز ژنتیکی جفتی بین جمعیتی (FST) ۰/۱۰۰ بود. با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA)، تنوع مولکولی بین جمعیتی (۱۵٪) و درون جمعیتی (۸۵٪) به دست آمدند. همچنین، مقادیر PhiPT و Nm، به ترتیب ۰/۱۴۹ و ۱/۴۳۲، نشان دادند که تمایز ژنتیکی متوسط و جریان ژنی کافی بین دو جمعیت مطالعه‌شده وجود دارد. FIS بالا و FST متوسط بر اهمیت ارزیابی مداوم تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های میگوی وانامی پرورشی در هرمزگان تأکید می‌کنند.

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی، ریزماهواره، نشانگر، هرمزگان، *Litopenaeus vannamei*.

۱. مقدمه

انتخاب توده‌ای^۱ شیوه‌ای رایج در سیستم‌های آبرزی پروری میگو است و کاربرد آن به طور معنی داری عملکرد تولید را بهبود می‌بخشد. در این روش، بزرگ‌ترین افراد زنده‌مانده به‌منزله مولد برای تشکیل نسل بعدی انتخاب می‌شوند. در این شرایط، اگر میگوهای مولد بدون در نظر گرفتن تولید میگوهای جوان انتخاب شوند، تنوع ژنتیکی^۲ جمعیت‌ها کاهش خواهد یافت. این تنوع ژنتیکی در کروموزوم‌ها و دیگر ساختارهای سلولی حاوی مولکول‌های DNA، که تشکیل ژن‌ها و تدوین بیوستز پروتئین را انجام می‌دهند، ذخیره شده است (Mustafa and Rahman, 1999). ازدست‌رفتن تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، به علت مدیریت نامناسب جمعیت‌های پرورشی، منجر به پیشینه^۳ باریک ژنتیکی، به واسطه درون‌آمیزی (De Donato et al., 2005)، می‌شود که در توسعه اصلاح نژاد ژنتیکی^۴ *Litopenaeus vannamei* در آینده سودمند نخواهد بود.

پایش ذخایر از نظر تنوع ژنتیکی، برای ارزیابی سطوح درون‌آمیزی در نتیجه جفت‌گیری تصادفی افراد نزدیک از نظر ژنتیکی (Norris et al., 2000)، و تضمین اینکه تنوع ژنتیکی در صفات مهم اقتصادی تحت تأثیر قرار نگرفته (Porta et al., 2006)، ضروری است. اگرچه درون‌آمیزی در جمعیتی پرورشی به خودی خود بد نیست، افزایش آن طی چندین نسل احتمال بیان آلل‌های مغلوب مضر را در زمان جفت‌شدن در وضعیت هموزیگوتی افزایش می‌دهد (Tave, 1993). وقتی که این مورد اتفاق می‌افتد، فروافت هم‌خونی^۵، به ویژه در جمعیت‌های

کوچک، ممکن است به کاهش بقا، نرخ رشد و تولیدمثل منجر شود (Gjedrem, 2005).

بدین منظور، دانش دربارهٔ نسب^۶ باید به وضوح برای تضمین جفت‌گیری در میان افراد غیر خویشاوند شناخته شود (Norris et al., 2000). از دیدگاه تتوریک با نشانگرهای DNA امکان مشاهده و کشف تنوع ژنتیکی در کل ژنوم ممکن است (Liu and Cordes, 2004). ریزماهوره‌ها در میان انواع نشانگرهای مولکولی یکی از بزرگ‌ترین امیدهای دانشمندان برای شناسایی ژنوتیپ‌های مختلف در داخل یک گونه‌اند. ریزماهوره‌ها، که همچنین به‌منزله توالی‌های ساده تکرارشونده^۷ شناخته می‌شوند، واحدهای تکراری از یک تاشش نوکلئوتید به صورت متوالی‌اند که در ژنوم یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها گسترده شده‌اند (Field and Wills, 2000; Toth et al., 1998). نحوه توارث همباز^۸ آنها، سطح بالای چندشکلی و سادگی کار باعث می‌شود که آنها در بسیاری از کاربردها مفید باشند. در این مطالعه نیز از نشانگرهای ریزماهوره برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در نمونه‌های مورد مطالعه استفاده شده است. با بروز بیماری ویروسی سندرم لکه سفید^۹ تلفات سنگینی در مزارع میگوی پرورشی کشور در سال‌های ۸۱-۸۲ به وقوع پیوست. به منظور تنوع گونه‌ای و معرفی گونه مقاوم‌تر، تعداد ۸۰ جفت مولد وانامی در سال ۸۳ از امریکا وارد شد (Afsharnasab et al., 2005). در همین سال مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، در پژوهشکده میگوی کشور، تحقیق دربارهٔ میگوی وانامی را شروع کرد و در سال ۸۴ به تکنیک تکثیر و پرورش میگوی وانامی دست یافت. در ضمن، تکثیر میگوهای پرورشی نسل سوم مولدین

6. Parentage

7. SSR

8. Codominant

9. WSSVD

1. Mass selection

2. Genetic diversity

3. Background

4. Genetic breeding

5. Inbreeding depression

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲ نمونه‌برداری

میگوهای وانامی در مرحله پست‌لاروی به طور تصادفی در تابستان ۹۰ از دو مزرعه امیری و گورگیج در جاسک استان هرمزگان نمونه‌برداری شدند. پست‌لاروها بلافاصله در اتانل ۹۶ درجه تثبیت شدند (Souza de Lima et al., 2008) و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه شیلات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انتقال یافتند.

۲.۲ استخراج DNA و تکثیر نشانگرهای

ریزماهوره

DNA ژنومی از ماهیچه و پاهای شقای پست‌لاروهای نمونه‌برداری شده با استفاده از کیت استخراج شرکت Bioneer (Genomic DNA K-3032 AccuPrep® Extraction Kit, Republic of Korea) با اندکی تغییرات همانند زیر به دست آمد (جدول ۱).

این میگو در دستور کار پژوهشکده میگوی کشور بوده است (National Shrimp Research Institute, 2008). در بندر جاسک استان هرمزگان نیز در سال ۹۰ تکثیر میگوهای وانامی پرورش یافته در بندر مقام (نسل سوم) و تیاب (نسل سوم) صورت گرفته است. به هر حال، در کشور ما با توجه به نبود اطلاعات دودمانی مشخص از مولدین وارداتی این میگو بررسی نتاج، به منظور دستیابی به برآوردی از وضعیت کنونی خزانه ژنتیکی و بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی میگوی وانامی، ضروری است. با توجه به اینکه جمعیت‌های بسته مولدین در اکثر هجری‌ها برای چندین نسل به کار می‌روند و هجری‌های میگوی وانامی در ایران نیز از این قاعده مستثنا نیستند، این جمعیت‌ها در معرض تأثیرات فروافت ناشی از درون‌آمیزی هستند؛ و از آنجا که مشکلات بالقوه فروافت ناشی از درون‌آمیزی می‌تواند تأثیرات منفی در تولید ملی داشته باشد، تنوع ژنتیکی و سطوح درون‌آمیزی دو مزرعه در جاسک هرمزگان ارزیابی شد.

بنابراین، هدف از مطالعه حاضر را می‌توان استفاده از نشانگرهای ریزماهوره‌ای به منظور پیگیری تفاوت‌ها در تنوع ژنتیکی و نشان دادن سودمندی نشانگرهای انتخاب شده در بررسی تنوع آلی برشمرد.

جدول ۱. معرف‌ها (اجزای) مورد استفاده در کیت

ملاحظات	دمای نگهداری (°C)	مقدار	معرف
افزودن ۱/۲۵ میلی لیتر آب مقطر، نگهداری در ۲۰- درجه سانتی‌گراد	دمای اتاق (۱۵-۲۵)	۲۵ میلی‌گرم	Proteinase K, lyophilized
اختلاط کامل قبل از مصرف	دمای اتاق	۲۵ میلی لیتر	Tissue Lysis buffer (TL)
اختلاط کامل قبل از مصرف	دمای اتاق	۲۵ میلی لیتر	Binding buffer (GC)
افزودن ۳۰ میلی لیتر از اتانول مطلق	دمای اتاق	۴۰ میلی لیتر	Washing buffer 1 (W1)
افزودن ۸۰ میلی لیتر اتانول مطلق	دمای اتاق	۲۰ میلی لیتر	Washing buffer 2 (W2)
-	دمای اتاق	۳۰ میلی لیتر	Elution buffer (EL)

جدول ۲. توصیف چهار نشانگر چندشکل ریزماهواره در میگوی سفید اقیانوس آرام (*L. vannamei*)

شماره دسترسی در بانک ژن	محدوده اندازه (جفت باز)	دمای اتصال تدریجی (°C)	توالی آغازگر (۵' به ۳')	توالی تکراری	نشانگر
AY062928	۱۶۳-۱۸۹	۶۰	F:TATGCTCGTTC CCTTTGCTT R:TTGAAGGAAA AGTGTGGGG	(T) ₁₀ (TC) ₇ ...(T) ₄ (TC)	P _{van} 1758
AF006629	۱۶۳-۲۲۵	۴۴	F:ACTAGTGGATC TGTCTATTC R:ATACCCACCC ATGCATGTTAG	...(TAGA) ₃ ...(TAGA) ₃ ... (ACAG) ₄ ...(AG) ₂₁ A(AG) ₃₀ ...	TUDGLv1 -3.224
AF006630	۱۲۱-۱۸۳	۵۶	F:TGCTAGAATGT CTTTCGAAG R:GTCTGGGGAA ATCTTTAATG	...(AC) ₁₁ AT(AC) ₁₄ ...(CA) ₃ ...	TUDGLv5 -7.33
AF006631	۱۲۵-۱۹۹	۵۲	F:ATGGTGAATAT AAGGAAGCT R:TGTGATATGGT TTTTGGAG	...(T) ₁₃ N(TA) ₄ ... (AC) ₁₀ ...(AC) ₁₁ ...	TUDGLv7 -9.17

برای ۱ min، ۶۰-۴۴°C (دمای اتصال تدریجی) برای ۱ min، ۷۲°C و برای ۱ min و مرحله گسترش پایانی ۷۲°C برای ۱۰ min.

۳.۲. آماده‌سازی آگارز متافور برای تفکیک

باند‌های حاصل از فرآورده‌های PCR

آگارز متافور، آگارز با دمای ذوب متوسط (۷۵ درجه سانتی‌گراد) است که توانایی تفکیک آن دو برابر توانایی تفکیک فرآورده‌های حاصل از آگارز دارای کیفیت عالی و خوب غربال‌شده است. در این پژوهش از ژل ۳٪ حاصل از پودر متافور شرکت کامبرکس^۲ همراه با اتیدیوم بروماید (Grzybowski, 2010)، به منظور تفکیک فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، استفاده شد.

چهار نشانگر ریزماهواره‌ای توصیف‌شده (جدول ۲)، برای واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز^۱ انتخاب شدند (Cruz *et al.*, 2004; Garcia & Alcivar- Warren, 2007). تکثیرها در حجم واکنش 25µl محتوی ۳ مایکرولیتر (۵۰ تا ۱۵۰ نانوگرم) از DNA الگو، ۱ مایکرولیتر از آغازگرهای forward و reverse، ۱۲/۵ مایکرولیتر از مسترمیکس کیت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (2X Taq Master Mix)، شرکت Vivantis (Malaysian Biotechnology Company) و ۷/۵ مایکرولیتر آب مقطر تزریقی انجام شدند. تکثیرهای ریزماهواره در Gene Amp PCR system (9600 thermocycler (USA) با پروتکل بهینه‌شده (Cruz *et al.*, 2004)، در شرایط زیر انجام شدند: ۹۴°C برای ۵ min، به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل؛ ۹۴°C

۴.۲. آنالیزهای آماری

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)^۱ با استفاده از نرم افزار GenAlix 6.41 رایج در علم ژنتیک جمعیت تجزیه و تحلیل خواهد شد (Peakall & Smouse, 2006). به این ترتیب که انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ (HWE) ($F_{IS}=0$ یا $F_{IS} \neq 0$), F_{ST} , فراوانی آللی، تعیین هموزیگوتی، هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار و تعداد آلل‌ها برای هر نشانگر محاسبه خواهد شد. همچنین، آماره‌هایی نظیر F_{IS} و F_{ST} برای برآورد میزان جریان ژنی (Nm)، و هم‌خونی، به کار خواهد رفت.

میانگین تعداد آلل‌ها (Na)، میانگین تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)، میانگین هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho)، میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار (He)، شاخص شانون (sHua)، میانگین محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC)، و میانگین شاخص تعادل هاردی-واینبرگ (HWE) در چهار نشانگر ریزماهوره در دو جمعیت میگوی وانامی، از طریق نرم‌افزار GenAlix 6.41 رایج در تجزیه و تحلیل علم ژنتیک جمعیت، برآورد شدند (ibid). در

ضمن، فاصله ژنتیکی (D) و ضریب تشابه ژنتیکی (I) در میان جمعیت‌ها همچنین از طریق روش Neis محاسبه شدند (Nei, 1972).

۳. نتایج

۱.۳. تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها

تنوع ژنتیکی دو جمعیت میگوی وانامی با استفاده از چهار نشانگر ریزماهوره خاص این گونه در جداول ۳ و ۴ نشان داده شده است. میانگین تعداد آلل‌ها (Na)، و تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) در هر جمعیت در سرتاسر نشانگرها به ترتیب محدوده‌ای از ۷/۵ تا ۷/۷۵، و ۴/۸۳۴ تا ۵/۱۴۸ بود. تعداد آلل‌ها در هر نشانگر، در نشانگر TUDGLv7-9.17 با ۸ تا ۱۰ آلل، به دنبال آن نشانگرهای TUDGLv5-7.33 و TUDGLv1-3.224 با ۸ آلل، و نشانگر P_{van}1758 با ۵ تا ۶ آلل بالاتر بود. میانگین هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho) و هتروزیگوتی مورد انتظار (He) به ترتیب محدوده‌ای از ۰/۴۵۸ تا ۰/۴۷۹، و از ۰/۷۹۱ تا ۰/۷۹۴ بود (جدول ۳).

جدول ۳. تنوع ژنتیکی یافت شده در دو جمعیت از میگوی *L. vannamei* در چهار نشانگر^۱

میانگین	نشانگر				جمعیت
	P _{van} 1758	TUDGLv1-3.224	TUDGLv7-9.17	TUDGLv5-7.33	
۱۴/۲۵۰	۱۴	۱۵	۱۵	۱۳	N
۷/۷۵۰	۵	۸	۱۰	۸	Na
۵/۱۴۸	۳/۹۲۰	۴/۸۳۹	۷/۵۰۰	۴/۳۳۳	Ne
۱/۷۹۴	۱/۴۷۰	۱/۷۷۵	۲/۱۵۳	۱/۷۷۷	I
۰/۴۷۹	۰/۰۰۰	۰/۷۳۳	۰/۸۰۰	۰/۳۸۵	Ho
۰/۷۹۴	۰/۷۴۵	۰/۷۹۳	۰/۸۶۷	۰/۷۶۹	He
۱۴/۷۵۰	۱۵	۱۵	۱۵	۱۴	N
۷/۵۰۰	۶	۸	۸	۸	Na
۴/۸۳۴	۴/۸۹۱	۴/۷۸۷	۵/۴۸۸	۴/۱۷۰	Ne
۱/۷۶۵	۱/۶۶۲	۱/۸۰۵	۱/۸۵۸	۱/۷۳۵	I
۰/۴۵۸	۰/۲۰۰	۰/۸۰۰	۰/۳۳۳	۰/۵۰۰	Ho
۰/۷۹۱	۰/۷۹۶	۰/۷۹۱	۰/۸۱۸	۰/۷۶۰	He

تعداد آل‌ها (Na) و هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho) کاهش درخور توجهی را در دو جمعیت امیری و گورگیج نداشتند. همچنین، شاخص تثبیت نزدیکی وضعیت هتروزیگوتی دو جمعیت مطالعه شده را نشان می‌دهد. عدد به دست آمده برای شاخص اطلاعات شانون (I) بیانگر تنوع بالای این دو جمعیت است (جدول ۵). همچنین محتوی PIC در هر نشانگر محدودهای از ۰/۸۷ تا ۰/۹ به دست آمد.

مقادیر Ho پایین‌تر از مقادیر He بودند، به جز نشانگر TUDGLv1-3.224 در جمعیت مزرعه امیری، که نشان‌دهنده نقص کلی انواع هتروزیگوتی برای نشانگرهای تحت مطالعه است (جدول ۴). همچنین شاخص تثبیت (F)، در نشانگر P_{van}1758 از جمعیت امیری، دارای بالاترین مقدار خود (۱) بود که باز هم نشان‌دهنده مخاطرات بالای هموزیگوتی در این نشانگر است.

جدول ۴. تعداد *Litopenaeus vannamei* آنالیز شده (N)، هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوتی مورد انتظار (He)، تعداد آل‌های مشاهده شده در هر نشانگر در دو جمعیت (NOA)، فراوانی شایع‌ترین آل (f(MC))، شایع‌ترین آل (MCA) و شاخص تثبیت (F) برای دو

جمعیت *L. vannamei*

جمعیت	نشانگرهای ریزماهورهای	N	Ho	He	NOA	f(MC)	MCA	F
	TUDGLv5-7.33	۱۳	۰/۳۸۵	۰/۷۶۹	۸	۰/۴۲۳	G	۰/۵۰۰
امیری	TUDGLv7-9.17	۱۵	۰/۸۰۰	۰/۸۶۷	۱۰	۰/۲۳۳	A	۰/۰۷۷
	TUDGLv1-3.224	۱۵	۰/۷۳۳	۰/۷۹۳	۸	۰/۲۸۳	B/D	۰/۰۷۶
	P _{van} 1758	۱۴	۰/۰۰۰	۰/۷۴۵	۵	۰/۳۲۱	C/E	۱
	TUDGLv5-7.33	۱۴	۰/۵۰۰	۰/۷۶۰	۸	۰/۴۲۹	K	۰/۳۴۲
گورگیج	TUDGLv7-9.17	۱۵	۰/۳۳۳	۰/۸۱۸	۸	۰/۲۵۰	I/L	۰/۵۹۲
	TUDGLv1-3.224	۱۵	۰/۸۰۰	۰/۷۹۱	۸	۰/۲۸۳	C/G	-۰/۰۱۱
	P _{van} 1758	۱۵	۰/۲۰۰	۰/۷۹۶	۶	۰/۲۵۰	H/J	۰/۷۴۹

جدول ۵. میانگین تعداد آل‌ها (Na)، میانگین تعداد آل‌های مؤثر (Ne)، میانگین هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho)، میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار (He) و میانگین شاخص تثبیت (F) در چهار نشانگر ریزماهوره در دو جمعیت میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

جمعیت	Na	Ne	I	Ho	He	F
امیری	۷/۷۵۰	۵/۱۴۸	۱/۷۹۴	۰/۴۷۹	۰/۷۹۴	۰/۴۱۳
گورگیج	۷/۵۰۰	۴/۸۳۴	۱/۷۶۵	۰/۴۵۸	۰/۷۹۱	۰/۴۱۸
میانگین	۷/۶۲۵	۴/۹۹۱	۱/۷۷۹	۰/۴۶۹	۰/۷۹۲	۰/۴۱۶

نشانگرهای TUDGLv7-9.17 و P_{van}1758، به ترتیب با ۱۰ و ۵ نوع آلل، بیشترین و کمترین میزان آلل‌ها را در این دو جمعیت به خود اختصاص دادند. حدود اندازه آللی در جمعیت‌های امیری و گورگیج در سرتاسر چهار نشانگر بررسی شده در محدوده ۲۳۰-۱۰۵ به دست آمد (جدول ۷).

نتایج آنالیز جفتی جمعیتی برای شاخص‌های شانون (sHua) و ضریب جریان ژنی (Nm)، که به ترتیب شاخص‌هایی از تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی هستند، در سرتاسر نشانگرهای چهارگانه در احتمال $P < 0.000$ معنی‌دارند (جدول ۶). در جمعیت‌های امیری و گورگیج به ترتیب ۲۵ و ۲۹ نوع آلل به دست آمد. جمعیت امیری در

جدول ۶. نتایج آنالیز جفتی^۱ جمعیتی شاخص شانون و ضریب جریان ژنی (Nm) برای داده‌های همباز در هر نشانگر

معنی‌داری	احتمال (P)	Nm	sHua	نشانگر	جمعیت
***	۰/۰۰۰	۰/۰۳۳	۰/۸۵۸	TUDGLv5-7.33	امیری- گورگیج
***	۰/۰۰۰	۰/۰۶۸	۰/۶۰۰	TUDGLv7-9.17	امیری- گورگیج
***	۰/۰۰۰	۰/۰۷۸	۰/۵۶۰	TUDGLv1-3.224	امیری- گورگیج
***	۰/۰۰۰	۰/۰۳۰	۰/۸۹۵	P _{van} 1758	امیری- گورگیج

P<0.001 :***

جدول ۷. تعداد آلل‌ها و حدود اندازه آللی (بر حسب جفت باز) در هر نشانگر از جمعیت

جمعیت	نشانگر	A(1)	B(2)	C(3)	D(4)	E(5)	F(6)	G(7)	H(8)	I(9)	J(10)	K(11)	L(12)	M(13)	N(14)
امیری	TUDGLv5-7.33	۱۹۴	-	۱۸۴	-	-	۱۵۲	۱۵۰	۱۴۷	-	۱۳۸	-	۱۲۸	-	۱۲۰
	TUDGLv7-9.17	۱۸۴	۱۸۰	۱۷۶	۱۷۰	۱۶۵	۱۶۲	-	-	۱۵۲	۱۴۵	۱۳۹	-	۱۰۵	-
	TUDGLv1-3.224	۲۳۰	۲۲۵	-	۲۱۰	۲۰۰	۱۹۴	-	-	۱۸۰	۱۷۵	-	۱۶۰	-	-
	P _{van} 1758	-	-	۱۸۸	-	۱۸۴	۱۷۶	۱۷۲	-	۱۶۷	-	-	-	-	-
گورگیج	TUDGLv5-7.33	-	۱۸۹	-	۱۷۸	۱۷۲	-	-	-	۱۴۴	-	۱۳۴	۱۲۸	۱۲۵	۱۲۰
	TUDGLv7-9.17	-	-	-	-	۱۶۵	-	۱۶۰	۱۵۵	۱۵۲	۱۴۵	۱۳۹	۱۲۲	۱۰۵	-
	TUDGLv1-3.224	-	۲۲۵	۲۱۷	۲۱۰	۲۰۰	-	۱۹۲	۱۸۲	-	۱۷۵	۱۶۷	-	-	-
	P _{van} 1758	۱۹۹	۱۹۶	-	۱۸۶	-	۱۷۶	-	۱۷۰	-	۱۵۵	-	-	-	-

در نشانگرهای TUDGLv1-3.224، TUDGLv7-9.17 و P_{van}1758، به ترتیب آل‌های نوع نهم (I) (۰/۱۶۷)، نوع دوم (B) (۰/۲)، و نوع پنجم (E) (۰/۱۷۹) بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند (جدول ۹).

دو جمعیت آنالیز شده مجموع ارزش‌های مثبت را طی برآورد آزمون F_{IS} نشان دادند (جدول ۱۰)؛ به این معنی که کاهش‌های کاملی از هتروزیگوتی در دو جمعیت تحت مطالعه وجود داشتند. به علاوه، تقریباً در همه نشانگرها، به استثنای نشانگر TUDGLv1-3.224 (۰/۱۱)، در جمعیت گورگیج، مقادیر شاخص تثبیت (F) برآورد شده مثبت بودند. منطبق بر نتایج جدول ۴، در نشانگر و جمعیت ذکر شده، مقدار هتروزیگوتی مشاهده شده، به سبب زیادی هتروزیگوتی، بالاتر از مقدار هتروزیگوتی مورد انتظار است.

با ملاحظه تعداد آل‌ها در سرتاسر نشانگرها، در مجموع ۵۵ نوع ژنوتیپ در بررسی این دو جمعیت یافت شد که در این میان نشانگرهای TUDGLv7-9.17 و TUDGLv1-3.224، به ترتیب در جمعیت‌های امیری و گورگیج، با ۱۳ و ۱۲ نوع ژنوتیپ بیشترین و نشانگر P_{van}1758، در جمعیت امیری، با ۵ نوع ژنوتیپ، کمترین تنوع ژنوتیپی را داشتند. ژنوتیپ‌های II و FF به ترتیب در نشانگرهای TUDGLv5-7.33 و P_{van}1758 جمعیت امیری بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. جمعیت امیری در نشانگرهای TUDGLv5-7.3333 و P_{van}1758 (P<0.001) و جمعیت گورگیج در نشانگرهای TUDGLv5-7.33 (P<0.01) و TUDGLv7-9.17 و P_{van}1758 (P<0.001)، از تعادل هاردی-واینبرگ انحراف داشتند (جدول ۸). در نشانگر TUDGLv5-7.33، آل‌های نوع هفتم (G) و یازدهم (K)، به ترتیب با فراوانی ۰/۲۱۲ و ۰/۲۱۴، و

جدول ۸. خلاصه آزمون‌های مربع کای برای تعادل هاردی-واینبرگ (HWS)

معنی‌داری	احتمال (P)	مربع کای	درجه آزادی	نشانگر	جمعیت
***	۰/۰۰۱	۵۷/۸۸۵	۲۸	TUDGLv5-7.33	امیری
ns	۰/۱۰۱	۵۷/۴۶۳	۴۵	TUDGLv7-9.17	
ns	۰/۴۴۱	۲۸/۴۴۱	۲۸	TUDGLv1-3.224	
***	۰/۰۰۰	۵۶	۱۰	P _{van} 1758	گورگیج
**	۰/۰۰۵	۵۰/۹۴۴	۲۸	TUDGLv5-7.33	
***	۰/۰۰۰	۷۶/۱۵۷	۲۸	TUDGLv7-9.17	
ns	۰/۷۳۷	۲۲/۹۲۰	۲۸	TUDGLv1-3.224	
***	۰/۰۰۰	۴۶/۷۱۹	۱۵	P _{van} 1758	

ns: غیر معنی‌دار؛ ** P<0.01؛ *** P<0.001

جدول ۹. میانگین فراوانی‌های آلی در دو جمعیت برای چهار نشانگر ریزماهواره

آلی	نشانگر			
	P _{van} 1758	TUDGLv1-3.224	TUDGLv7-9.17	TUDGLv5-7.33
۱	۰/۰۸۳	۰/۰۱۷	۰/۱۱۷	۰/۰۳۸
۲	۰/۰۱۷	۰/۲	۰/۰۵	۰/۰۱۸
۳	۰/۱۴۳	۰/۱۸۳	۰/۰۳۳	۰/۰۵۸
۴	۰/۰۶۷	۰/۱۵	۰/۰۳۳	۰/۰۱۸
۵	۰/۱۷۹	۰/۱۱۷	۰/۰۶۷	۰/۰۳۶
۶	۰/۱۱۹	۰/۰۱۷	۰/۰۳۳	۰/۰۳۸
۷	۰/۰۷۱	۰/۱	۰/۰۶۷	۰/۲۱۲
۸	۰/۱۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۳۸
۹	۰/۰۷۱	۰/۰۵	۰/۱۶۷	۰/۰۵۴
۱۰	۰/۱	۰/۰۸۳	۰/۱۵	۰/۰۵۸
۱۱	۰/۰۰۰	۰/۰۱۷	۰/۰۵	۰/۲۱۴
۱۲	۰/۰۰۰	۰/۰۱۷	۰/۱	۰/۰۷۴
۱۳	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۸۳	۰/۰۵۴
۱۴	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۹۱

جدول ۱۰. مقدار F_{IS} برآوردشده برای دو جمعیت *L. vannamei*

میانگین	جمعیت		نشانگر
	گورگیج	امیری	
۰/۴۱۰	۰/۴۲۱	۰/۳۹۷	کل

گورگیج ۰/۱۴۹، و فاصله ژنتیکی بین این دو جمعیت ۱/۹۰۲ بود (جدول ۱۲). مشخص است که هرچه میزان همانندی^۱ ژنتیکی کمتر باشد، فاصله ژنتیکی بیشتر خواهد بود.

جدول ۱۲. همانندی ژنتیکی (I) Neis و فاصله ژنتیکی (D) در دو

جمعیت <i>Litopenaeus vannamei</i>			
جمعیت	گورگیج	امیری	جمعیت
امیری	۱/۹۰۲	۱/۰۰۰	امیری
گورگیج	۱/۰۰۰	۰/۱۴۹	گورگیج

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

مقادیر F_{ST} جفتی برآوردشده تمایز ژنتیکی متوسطی را بین دو جمعیت مطالعه‌شده نشان داد. این موضوع را می‌توان از مقدار Nm جفتی به دست آمده دریافت (جدول ۱۱).

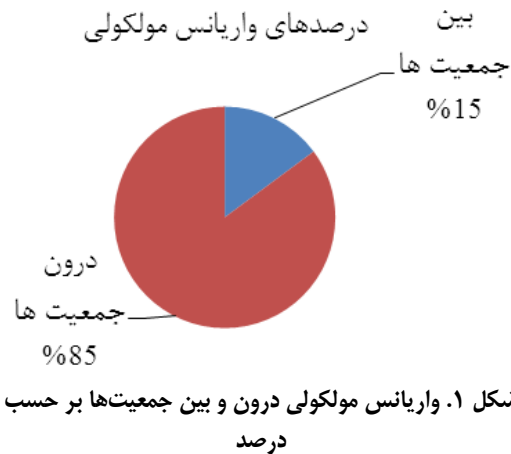
جدول ۱۱. برآوردهای F_{ST} جفتی و Nm جفتی در بین دو

جمعیت <i>L. vannamei</i>			
جمعیت	گورگیج	امیری	جمعیت
امیری	۲/۲۳۸	۰/۰۰۰	امیری
گورگیج	۰/۰۰۰	۰/۱۰۰	گورگیج

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

ضریب تشابه ژنتیکی بین دو جمعیت امیری -

جریان ژنی کافی بین جمعیت‌های بررسی شده وجود دارد (جدول ۱۴).



۲.۳. آنالیز واریانس مولکولی

دو جمعیت مطالعه شده به ترتیب تنوع مولکولی درون و بین جمعیتی زیاد و کم دارند (شکل ۱) که این مهم با در نظر گرفتن مقادیر به دست آمده برای مجموع مربعات درون و بین جمعیتی و نیز واریانس برآورد شده به خوبی درخور فهم است (جدول ۱۳). ورودی به منزله ماتریکس فاصله ژنوتیپی همباز برای محاسبه PhiPT است.

آماره PhiPT و ضریب جریان ژنی (Nm) محاسبه شده از طریق برآورد واریانس مولکولی، با استفاده از نرم افزار GenAlEx 6.41، به ترتیب نشان دادند که تمایز ژنتیکی متوسط از دیدگاه ژنوتیپی و

جدول ۱۳. آنالیز واریانس مولکولی

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	برآورد واریانس	درصد٪
میان جمعیت‌ها	۱	۱۰/۳۸۷	۱۰/۳۸۷	۰/۵۰۱	۱۵٪
درون جمعیت‌ها	۲۸	۸۰/۳۶۸	۲/۸۷۰	۲/۸۷۰	۸۵٪
کل	۲۹	۹۰/۷۵۵	۱۳/۲۵۷	۳/۳۷۱	۱۰۰٪

جدول ۱۴. آماره PhiPT نشان دهنده تمایز ژنتیکی

آماره	مقدار	P(rand>=data)
PhiPT	۰/۱۴۹	۰/۰۱۰
Nm	۱/۴۳۲	

Tamayo, 2006; Garcia & Alcivar- Warren, Luvesuto *et al.*, 2007; Olfus *et al.*, 1997; Cruz *et al.*, 2002; Borrell *et al.*, 2005; Duenas *et al.*, 2005). پرز- انریکو و همکاران (۲۰۰۹) کاهش ۲۰٪ هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho) را در پنج تا شش

۴. بحث و نتیجه گیری

نشانه‌های خاص از مرور منابع به منزله متنوع‌ترین نشانه‌ها برای این گونه انتخاب شدند (Cruz *et al.*, 2002, 2004; Valles *et al.*, 2005; Machado -

داده شود (Machado-Tamayo, 2006). در گونه‌های گرمسیری، همچون میگوی وانامی، جریان ژنی (Nm) بالاتر از یک نشان‌دهندهٔ یکنواخت بودن فراوانی آللی و عدم ناجورشدگی^۱ ژنتیک جمعیت است. در جمعیت‌های جفتی امیری-گورگیج، به علت ناکافی بودن جریان ژنی، در شاخص شانون که بر مبنای فراوانی آللی است تفاوت معنی‌دار و درخور توجهی دیده می‌شود. این موضوع را می‌توان از تفاوت فراوانی آللی دریافت که در جمعیت‌ها و نشانگرهای ذکر شده معنی‌دار است (Oliveira et al., 2006). محدودهٔ اندازهٔ آللی در سه نشانگر، غیر از $P_{van} 1758$ ، نشان‌دهندهٔ سطح بالایی از تنوع آللی به‌رغم تکثیر در اسارت است. در این سه نشانگر، تفاوت اندازهٔ آللی به‌دست‌آمده را در محدوده‌ای از ۷۹-۵۸ جفت باز؛ Garcia & Alcivar-Warren (2007) در میگوی پرورشی ۷۴-۳۲ جفت باز و در میگوی وحشی ۱۸۰-۷۷ جفت باز مشاهده کردند. تفاوت‌های بزرگ‌تر مشاهده‌شده در محدودهٔ اندازهٔ آللی به وجود آلل‌های خنثی یا جهش‌ها نسبت داده شد (Garcia & Alcivar-Warren, 2007). Machado-Tamayo (2006) بیان داشت که نقص هتروزیگوتی منجر به انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ می‌شود. در این مطالعه، در جمعیت‌های امیری و گورگیج، به ترتیب دو و سه نشانگر از تعادل هاردی-واینبرگ انحراف داشتند. در نشانگرهایی که انحراف از تعادل مشاهده می‌شود، ما کمبود H_o را نسبت به He داریم. در نشانگرهای TUDGLv5- (He: 0.769 و H_o : 0.385) و در نشانگرهای $P_{van} 1758$ (He: 0.745 و H_o : 0)؛ در جمعیت امیری

نسل ملاحظه کردند که معادل افزایش ۱۸٪ درون‌آمیزی است. در این مطالعه کاهش ۳۸٪/۴ هتروزیگوتی مشاهده‌شده (۰/۴۷۹ به ۰/۴۵۸) در جمعیت امیری-گورگیج دیده شد که نشان‌دهندهٔ افزایش ۹۴٪/۳ درون‌آمیزی است (Perez-Enriquez et al., 2009). همچنین، میانگین هتروزیگوتی جمعیت‌های *Litopenaeus vannamei* بالاتر از ۰/۵ (۰/۸۷-۰/۸۹) است که نشان‌دهندهٔ تنوع ژنتیکی غنی دو جمعیت بررسی شده از دیدگاه تنوع آللی است (Zhi-min et al., 2010). میانگین PIC به‌دست‌آمده (۰/۸۸) نشان‌دهندهٔ به‌شدت چندشکل بودن نشانگرهای مورد مطالعه است که می‌تواند بیانگر کافی بودن تعداد والدین شرکت‌کننده در تشکیل نسل بعد باشد؛ بدین مفهوم که به‌رغم انتخاب، تنوع ژنتیکی از دیدگاه تنوع آللی در سطح وارسته‌های اصلی حفظ شده است (ibid). در نشانگر $P_{van} 1758$ ، Na و H_o کمتر و Ne و He در محدودهٔ مقادیر به‌دست‌آمده (Perez-Enriquez et al., 2009) هستند. در این مطالعه، میانگین تعداد آلل‌ها از نظر نشانگری ۵/۵ تا ۹، مشابه با Cruz et al., 2004، به دست آمد. از جنبهٔ تعداد آلل‌ها به‌منزلهٔ شاخص اصلی تنوع ژنتیکی، کاهش ۲۳٪/۳ تعداد آلل‌ها از جمعیت امیری (۷/۷۵) به جمعیت گورگیج (۷/۵) مشاهده شد (Perez-Enriquez et al., 2009). بالابودن میانگین شاخص تثبیت (F) را، که نشان‌دهندهٔ افزایش تثبیت آللی و کاهش هتروزیگوتی است، می‌توان از تفاوت درخور توجه در میانگین H_o (۰/۴۶۹) نسبت به He (۰/۷۹۲) دریافت که معادل کاهش ۷۸٪/۴ سطوح هتروزیگوتی از دیدگاه جمعیتی است و می‌تواند به اثر شدید bottleneck در جمعیت بنیان‌گذار نسبت

۰/۰۵، تمایز متوسط؛ ۰/۲۵ - ۰/۱۵، تمایز وسیع؛ و بیشتر از ۰/۲۵ به معنی تمایز به شدت وسیع و زیاد است (Zhi-min *et al.*, 2010). فاصله ژنتیکی کوچک تر جمعیت، زمان تمایز کوتاه تر و ارتباط ژنتیکی نزدیک تر و تنوع ژنتیکی پایین تر و ضریب تشابه بزرگ تر را به دست می دهد.

F_{ST} جفتی جمعیتی در مطالعه ما، ۰/۱۰۰، نشان دهنده تمایز ژنتیکی متوسط در بین دو جمعیت مطالعه شده است. از طرف دیگر، آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) مقدار ۰/۱۴۹ را برای PhiPT از دیدگاه فاصله ژنوتیپی برآورد کرد که باز هم نشان دهنده تمایز ژنتیکی متوسط در این دو جمعیت است (ibid).

در جمع بندی نهایی، شاخص های PIC و شانون وضعیت آلی خوبی را ارائه می کنند. F_{IS} بالا و F_{ST} متوسط بر اهمیت ارزیابی مداوم تنوع ژنتیکی در جمعیت های میگوی وانامی پرورشی در هرمزگان تأکید می کنند. ضرایب جفتی جمعیتی شاخص شانون (sHua) و جریان ژنی (Nm)، که به ترتیب شاخص های تنوعی درون و بین جمعیتی اند، نشان دهنده ناکافی بودن جریان ژنی و معنی داری بالای تنوع درون جمعیتی است. Ho صفر، و در نتیجه F حداکثری (۱)، همچنین، فراوانی خیلی اندک بعضی از آلل ها (۰/۰۰۰) نشان دهنده مخاطرات بالای هموزیگوتی است و ضرورت توجه به مدیریت مولدین را از جنبه حفظ شاخص های تنوع ژنتیکی و ممانعت از فرسایش ژنتیکی دوچندان می کند. با توجه به مطالب ذکر شده، اهمیت معرفی افراد دارای خزانه ژنتیکی غنی، با در نظر گرفتن شرایط بهداشتی از منظر جلوگیری از ورود عوامل بیماری زا و حفظ صفات پرورشی، همچنین دورگه گیری بین جمعیت های گوناگون بیشتر مشخص می شود.

و در سه نشانگر استفاده شده در جمعیت گورگیج، غیر از TUDGLv1-3.224، چنین کمبودی مشاهده شد. در نشانگرهای TUDGLv5-7.33 شش آلل، TUDGLv7-9.17 و TUDGLv1-3.224 سه و چهار آلل و در P_{van} 1758 یک آلل با فراوانی اندک (۰/۰۴ - ۰/۰۱) مشاهده شدند. فراوانی بعضی از آلل ها برابر با صفر (۰/۰۰۰) است، در نتیجه مخاطرات بالای هموزیگوتی محتمل است (Garcia & Alcivar- Warren, 2007). در مطالعه ما، ضریب درون آمیزی (F_{IS})، ۰/۴۲/۱ - ۰/۳۹/۷ به دست آمد. در نشانگر TUDGLv1-3.224 جمعیت گورگیج، مقدار شاخص تثبیت (F)، ۰/۰۱۱ - برآورد شد که نشان دهنده زیادی هتروزیگوتی است (Souza de Lima *et al.*, (Ho>He) (2008). انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ به سبب کسر و کمبود هتروزیگوتی همان است که ضریب درون آمیزی نشان داده است. کسر و کمبود هتروزیگوتی می تواند ناشی از شکست در تکثیر یکی از آلل ها باشد؛ در این مطالعه نمونه های دوم و سوم جمعیت امیری و سی ام جمعیت گورگیج در نشانگر TUDGLv5-7.33 نمونه نهم جمعیت امیری در نشانگر P_{van} 1758 تکثیر نشدند. همچنین، اثر وهلوند، یعنی تقسیم شدن جمعیت محلی به واحدهای تولیدمثلی مجزا و متمایز، منجر به فقدان هتروزیگوتی می شود (Machado- Tamayo, 2006). پنایده ها می توانند درون آمیزی ۰/۲۸ و ۰/۳۲ تا ۰/۸۰ را تحمل کنند. (Moss *et al.* (2007) توصیه کردند که درون آمیزی نباید از ۰/۱۰ بالا رود (Perez- Enriquez *et al.*, 2009).

از دیدگاه ضریب تمایز ژنتیکی (F_{ST}) مقدار ۰/۰۵ - ۰، برای این شاخص، تمایز ضعیف؛ ۰/۱۵ -

References

- [1]. Afsharnasab, M., Dashtiannasab, A., Yeganeh, V., 2005. Assessing pathogenesis of the White Spot Syndrome Virus (WSSV) in the whitelegged shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Iranian scientific fisheries journal, spring 16 (1), 1-8.
- [2]. Cruz, P., C. H. Mejia-Ruiz, R., Perez-Enriquez & A. M. Ibarra., 2002. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. Molecular Ecology Notes 2, 239– 241.
- [3]. 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.
- [4]. De Donato, M., Manrique, R., Ramirez, R., Mayer, L., Howell, C., 2005. Mass selection and inbreeding effects on a cultivated strain of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in Venezuela. Aquaculture 247, 159–167.
- [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., Alcivar-Waren, A., 2007. Characterization 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, 364 p.
- [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]. Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238, 1–37.
- [10]. Luvesuto, E., Domingues de Freitas, P., 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.
- [11]. 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.
- [12]. Mustafa, S., and Rahman, R.A., 1999. Marine genetic resources and sustainable fisheries management. In: Mustafa, S. (ed.), Genetics in Sustainable Fisheries Management. Blackwell Science, Oxford, pp. 75–98.
- [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., Bradley, D.G., 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., Padua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., Carneiro Vieira, M.L., 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics and Molecular Biology 29, 2, 294-307.

- [17]. Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GenAEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.
- [18]. Perez-Enriquez, R., Hernandez-Martinez, F., Cruz, P., 2009. Genetic diversity status of White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* broodstock in Mexico. *Aquaculture* 297, 44-50.
- [19]. Porta, J., Porta, J.M., Martinez-Rodriguez, G., Alvarez, M.D., 2006. Development of a microsatellitemultiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture* 256 (1-4), 159-166.
- [20]. Souza de Lima, A.P., Lira dos Santos, A.C., Dantas, H.L., Gomes Filho, M.A., Maggioni, R., 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]. Tave, D., (1993). *Genetics for fish hatchery managers*, 2nd ed. Van Nostrand-Reinhold, New York, pp. 415.
- [22]. Toth, G., Gaspari, Z., Jurka, J., 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* 10, 967-981.
- [23]. Valles-Jiménez, R., Cruz, P., Perez-Enriquez, R., 2005. Population genetic structure of Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology* 6, 475-484.
- [24]. Zhi-min, L., Li, X., Fu-liang, Y., 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.