وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران – پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان
پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور-پژوهشکده میگوی کشور

عنوان طرح توتک :

مطالعه ژنتیک به منظور اصلاح نژاد و بهبود روش پرورش میگوی بومی ایران

مجری:
سهراب رضوانی گیل کلائی

شماره ثبت:
۸۹/۱٤۸۹

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان- پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور- پژوهشکده میگوی کشور

- **عنوان پروژه/ طرح توتک :** مطالعه ژنتیک به منظور اصلاح نژاد وبهبود روش پرروش میگوی بومی ایران
- **شماره مصوب:**۲۰۹۷۶
- **نام و نام‌خانوادگی نگارنده/ نگارندگان:** سهراب رضوانی گیل کلائی
- **نام و نام‌خانوادگی مجری مسئول(اختصاص به پروژه‌ها و طرحهای ملی و مشترک دارد):-**
- **نام و نام‌خانوادگی مجری/ مجریان:** سهراب رضوانی گیل کلائی
- **نام و نام‌خانوادگی همکاران:** روان شاد مهراب بنافی- روان شاد مختار حق نجات- جاسم مرمضی- وحید یگانه- بابک قائدنیا- سیروس امیرینیا- صبوحی اسدی- رمضانزاده- اردشیر نجاتی
- **نام‌ونام‌خانوادگی مشاور(ان) :** -
- **محل اجرا:** استان‌های خوزستان- بوشهر- هرمزگان
- **تاریخ شروع:**۸۰/۱۲/۱
- **مدت اجرا:**۲سال
- **ناشر: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران**
- **شمارگان(تیتراژ):۲۰ نسخه**
- **تاریخ انتشار: سال ۱۳۹۰**

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است- نقل مطالب تصاویر،جداول،منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

«سوابق طرح یا پروژه و مجری»

طرح / پروژه: مطالعه ژنتیک به منظور اصلاح نژاد وبهبود روش پرروش میگوی بومی ایران

کد مصوب : ۲۰۹۷۶

شماره ثبت (فروست) : ۸۹/۱۴۸۹ تاریخ : ۸۹/۱۱/۲۳

با مسئولیت اجرایی جناب آقای سهراب رضوانی گیل کلائی دارای مدرک تحصیلی دکترا در رشته ژنتیک می‌باشد.

طرح/پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فناوری و فرآوری آبزیان در تاریخ ۱۳۸۸/۱۲/۱۱ مورد ارزیابی و با نمره ۱٤و رتبه متوسط تأیید گردید.

در زمان اجرای طرح یا پروژه، مجری در :

ستاد ■ مرکز □ ایستگاه□

با سمت رئیس موسسه تحقیقات شیلات ایران مشغول بوده است.

به نام خدا

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
مقدمه ۲
۱-۱- طبقه بندی میگو ۳
۱-۲- پراکندگی جغرافیایی و محل زیست مهمترین گونه های تجاری میگو ۷
۱-۳- تاریخچه پرورش میگو در ایران و جهان ۱۵
۱-۴- ریخت شناسی ۲۰
۱-۵- روش های کلاسیک و مدرن و دستکاریهای ژنتیکی در سطوح کروموزومی و به گزینی در میگو .. ۳۷
۱-۶- روشهای کلاسیک و مدرن و دستکاریهای ژنتیکی در سطوح به گزینی در میگو ۵۴
۱-۷- روشهای کلاسیک اصلاح نژاد ۵۷
۱-۷-۱- به گزینی جهت دار فردی برای صفت ۵۸
۱-۷-۲- آمیزش خویشاوندی ۶۲
۱-۷-۳- دو رگه رگیری ۶۵
۱-۸- ایمنی شناسی میگو ۷۹
۲- مواد و روش ها ۹۴
۲-۱- نمونه برداری ۹۴
۲-۲- استخراج DNA ۹۴
۳- نتایج ۱۰۷
۴- بحث ۱۱۹
پیشنهادها ۱۲۹
منابع ۱۳۰
پیوست ۱۳۷
چکیده انگلیسی ۱۴۱

چکیده

نمونه برداری از ۹۰ میگوی حاصل از تکثیر تعداد ی مولد *Peneaus indicus* در یک روز مشابه و پرورش آن به طور هم زمان دریک استخرانجام گرفت. میگوها بر اساس طول وزن درسه گروه با رشد کم ، متوسط و زیاد طبقه بندی شدند($P\leq0.05$). استخراج DNA با استفاده از ۲ گرم بافت عضله از هر کدام از نمونه ها و سپس واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از ۲۱ آغازگررپید انچام گرفت و محصول واکنش بر روی ژل اگاروز۳٪ الکتروفورز گردید. از ۲۱ آغازگر مورد *بررسی* ۱۲ آغازگر روی ژل تولید باندهای پلی مورفیک نمودند . بیشترین نوار چند شکلی توسط آغازگر۹ و کمترین آن، توسط آغازگر۷ حاصل شد. براساس فاصله Nei(1972) بیشترین فاصله بین گروه با رشد متوسط و گروه با رشد کوچک (۰/۴۵۷) و کمترین فاصله بین گروه با رشد متوسط و گروه با رشد زیاد (۰/۰۹۱) به دست آمد. درخت ژنتیکی رسم شده با استفاده از فاصله Nei(1972 , 1978) میگوهای با رشد کم را در یک گروه و جدا از میگوهای با رشد متوسط و زیاد قرارداد که به نظرمی رسد میگوهای با رشد کم به جمعیت جداگانه ای از دو گروه دیگر تعلق دارند. همچنین بیشترین شباهت بین گروه با اندازه متوسط و گروه با اندازه بزرگ (۰/۹۱۲) و کمترین شباهت بین گروه با اندازه متوسط و گروه با اندازه کوچک(۰/۶۳۳) محاسبه گرید. در این بررسی با در نظر گرفنن میانگین وزنی نتاج حاصله (نسل F1) ۱/۵±۱۶/۲، میانگین وزنی گله۱/۲ ± ۱۵، میانگین وزنی والدین مورد بررسی ۳۱/۶، میزان پاسخ به به گزینی(R) ۰/۲±۱/۲ و میزان وراثت پذیری برای صفت رشد دراین مطالعه ۰/۰۱± ۰/۰۷ تخمین زده شد. در بخش دیگر مطالعه، باندهای اختصاصی تعیین توالی گردید و طراحی پرایمرانجام گرفت. آزمایش آن روی میگوهای هم سن، اقداماتی ضروری درادامه این تحقیق است.

لغات کلیدی: میگوی سفید هندی، افزایش وزن، نشانگر رپید، ایران

۱- مقدمه

میگوهای خانواده پناییده[1] ، به طور وسیع در آبهای ساحلی مناطق استوایی و نیمه استوایی جهان پراکنده هستند. بهره اقتصادی صید و صادرات میگوی خانواده پناییده در طی نیم قرن اخیر، فکر تولید و پرورش این میگو را در کشورهایی که از لحاظ اکولوژیک برای پرورش میگو مستعد هستند ایجاد نمود و این مسئله با افزایش صید بی رویه که منجر به کاهش توان تجدید شوندگی ذخایر شد، تقویت گشت. پرورش آبزیان دریایی به ویژه میگو در کشور ما نیزبه سرعت در حال توسعه است و در طی دههٔ اخیر، اقدامات عملی وسیعی جهت شناسایی استعدادهای بالقوه در سواحل جنوبی کشور، صورت گرفته است که حاصل آن، احداث هزاران هکتار استخردراراضی شناسایی شدهٔ سواحل خلیج فارس و دریای عمان بوده است. انگیزهٔ اصلی چنین گسترشی، ارزش غذایی بالای میگو به عنوان یک غذای لوکس در جوامع پیشرفته است که برنامه ریزان کشور را به توسعه تولید میگوهای پرورشی و افزایش فعالیتهای اقتصادی در مناطق محروم و جنوب کشور تشویق نموده تا بدین ترتیب از وابستگی ارزی کشوربه نفت کاسته شود و استقلال اقتصادی واقعی را به ارمغان آورد. نگاهی به جریان رشد و شکوفایی این صنعت در کشورهای صاحب نام و مسایل و مشکلاتی که هم اکنون گریبان گیر آن می باشند، الگویی مناسب جهت تعیین استراتژی های توسعه و پیشگیری از ضایعاتی که تولید اقتصادی میگو را تهدید می کنند ، فراهم می آورد. در بعضی از کشورها مانند تایوان که تولید میگوی پرورشی در طی دوران رشد این صنعت به چند برابر رسیده بود ، هم اکنون با کاهش چشمگیر ناشی از بروز بیماریهای عفونی و غیر عفونی در تولید روبرو شده اند. بدین منظور در کنار تلاش برای افزایش سطح کشت، توجه به بهینه سازی شرایط پرورش (بهبود نوع و روش تغذیه، مدیزیت آب،..) و درسطح بالاتر مسائل ژنتیکی و اصلاح نژاد و توجه به صفات اقتصادی هم چون رشد نمایان تر می گردد. ارزش میگو در بازار داخلی و خارجی بر اساس اندازه آن تعیین می شود. معمولاً میگوهای درشت تر با قیمت بالاتری در بازار عرضه می شوند. بنابراین یکی ازراههای افزایش درآمد حاصل از تولید میگوی پرورشی، به دست آوردن میگوهای با اندازه درشت تری باشد. این مطالعه و تحقیق در پی روشهای ژنتیکی است که منجر به کشف نشانگرهایی شود که امکان غربالگری را درمولدین برای دست یابی به نسلی که دارای سرعت رشد بیشتر، ضریب تبدیل غذایی پایین تر و کیفیت گوشت

1.Penaeidae

بالاترممکن سازد. استفاده ازشیوهٔ مطالعات کتابخانه ای، پایگاههای اینترنتی و انجام آزمایش های صحرایی وهم چنین آزمایش هایی با استفاده ازروش مولکولی RAPD و تجزیه و تحلیل یافته های ناشی از بیومتری میگوهای هم سن و طبقه بندی آنها در سه گروه با رشد کم، رشد متوسط و رشد سریع اساس این تحقیق را تشکیل می دهد. این گزارش در واقع مجموعه به هم پیوسته ازمطالبی است که شناخت و به کار بستن آنها می تواند در بهبود و اصلاح روشهای تولید میگو موٴثرباشد.

۱-۱- طبقه بندی میگو

سخت پوستان (Crustacea) بزرگترین زیر شاخه ازشاخهٔ بند پایان (Sub phylum) به شمارمی آیند که بیش از ۴۲۰۰۰ گونه را در خود جای داده اند، اکثراً دریازی بوده و تعدادی نیز ساکن آبها ی شیرین، برخی خشک زی به شمار می آیند. این زیر شاخه دارای ۱۰ رده (Class) است که در این میان سخت پوستان عالی (Malacostraca) از جایگاه ویژه ای برخوردارند که حدود ۳/۴ گونه های سخت پوستان را شامل می شوند. راستهٔ ده پایان (Decapoda) که به دلیل داشتن ۱۰ پا (۵ جفت پای قدم زن) به این نام خوانده شده است از این رده منشاٴ گرفته اند، دارای زیر راسته Penaeidae هستند. مهمترین و بیشترین اقلام سخت پوستان تجاری به این زیر راسته تعلق دارند که از دو فوق خانوادهٔ Sergestoidea و Penaeoidae تشکیل شده است. فوق خانواده Penaeoidae دارای چهار خانواده است که خانواده Penaeidae بزرگترین زیر خانواده و دارای بیش از ۳۰۰ گونه (Species) در سراسر جهان بوده که در ۱۲ جنس (Genus) جای گرفته اند و تقریبا ۸۰ درصد آنها از نظر تجاری به صورت صید مهم هستند. تمامی ۲۴ گونه میگویی که به نوعی در جهان تکثیرمی شوند و پرورش می یابند متعلق به این خانواده هستند.

جدول ۱-۱ : طبقه بندی میگوهای پناییده

Arthropoda	بندپایان	(Phylum):	شاخه
Crustacea	سخت پوستان	(Class):	رده
Malacostraca	سخت پوستان عالی	(Sub class):	زیر رده
Eumalacostraca	سخت پوستان عالی حقیقی	(Series):	سری
Eucarida	خرچنگهای حقیقی	(Superorder):	فوق راسته
Decapoda	ده پایان	Order): (	راسته
Dendrobranchiata	ده پایان شناگر	(Sub order):	زیر راسته
Natantia			
Penaeidea	پناییده آ	(Infra order):	دون راسته
Penaeoidae	پنااوئیده	(Super Family):	فوق خانواده
Penaeidae	پناییده	(Family):	خانواده
Penaeus	پنئوس	(Genus):	جنس
Semisulcatus	سمی سولکاتوس	Species): (	گونه
Monodon	مونودون		گونه
Merguensis	مرگوئنسیس		گونه
Indicus	ایندیکوس		گونه
Vannami	وانامی		گونه

اهمیت شیلاتی در جهان و ایران

صید و صیادی در سواحل خلیج فارس و دریای عمان ثابت کرده که میگو در امتداد سواحل اختصاصی ایران به وفور وجود دارد و میران صید آن در اطراف بندر دیلم ، راس المطاف و بندر عباس ، بیش از سایر صیدگاه هاست (نوربخش، ۱۳۷۰). درآبهای خلیج فارس و دریای عمان، حدود ۱۸ گونه میگو شناسایی شده اند، که بهره برداری اقتصادی برای صادرات از ۲ گونهٔ آ ن که درشت تر و فراوان تر ند، صورت می گیرد و مهمترین گونهٔ اقتصادی از نظر صید و صیادی، میگوی ببری سبز *Penaeus semisulcatus* است، که دربیشتر زیستگاه های خلیج فارس و دریای عمان یافت می شود، اما بیشترین پراکنش و صید آن در آبهای ساحلی استان بوشهر به ثبت رسیده است. میگوی موزی *Penaeus merguensis* که از نظر تجاری در ردهٔ دوم اهمیّت قرار دارد، بیشتر درآب های استان هرمزگان به بهره برداری رسیده است. سایر گونه ها مثل میگوی سفید هندی *Penaeus indicus*، میگوی ژاپنی *Penaeus japonicus* علی رغم داشتن جثّهٔ درشت، به دلیل کمی تعداد و محدودیت زیستگاه ، مورد بهره برداری اقتصادی قرار نمی گیرند. سه گونه میگوی خنجری، سفید و ریز سفید در سر تا سر

خلیج فارس ودریای عمان به صورت پراکنده موجود است امّا ارزش صادراتی ندارند. بهره برداری از این سه گونه بیشتر برای مصرف در بازارهای محلی و منطقه ای صورت می گیرد (متین فر، ۱۳۸۶).

از کوچک ترین نوع میگوهای خلیج فارس و سواحل شمال غربی آن که در زبان محلی به آنها «سرتیز » و «کنتک» می گویند برای تهیهٔ کنسرو استفاده می شوند .

رشد روز افزون جمعیت و کمبود مواد پروتئینی در کشورهای در حال توسعه، مشکلاتی جدی برای نیازهای غذایی مردم به وجود آورده است و طبق نظریه کارشناسان سازمان خوار و بار و کشاورزی ملل متحد از میزان ۱۰۰ میلیون تن صید آبزیان تنها حدود ۳۰۳ هزار تن مربوط به ایران بود که رقم بسیار پایینی است(شرکت بازرگانی شیلات ایران، ۱۳۶۹؛ ۱۳۷۰) . بررسی آمار صید ۱۵ سال اخیر میانگین بهره برداری سالانه ۶۴۰۰ تن میگو از صیدگاه های خلیج فارس ودریای عمان نشان می دهد که زمینهٔ افزایش تولید میگو تنها از بعد آبزی پروری ثبات یافته است (متین فر، ۱۳۸۶).

میگو این جاندار گرانبها اگر به میزان کافی تکثیر و پرورش یابد و صید دریایی آن نیز با ناوگان صیادی مدرن و مجهز صورت گیرد و همچنین بازاریابی وفروش بین المللی در اختیار باشد می تواند پس از نفت و گاز درآمد عمده ای را در امر صادرات کشور داشته باشد با در نظر گرفتن ارزش جهانی میگو و قیمت متوسط هر کیلوگرم ۵ تا ۱۰ دلار، اهمیت این محصول گرانبها و ارزش صا دراتی آن مشخص می شود .

در چهار چوب اقتصاد ملی کشورهای منطقه سهم بخش شیلات در تولید ناخالص داخلی حدوداً زیر یک درصد است و تجارت ماهی و میگو قسمت کوچکی از کل صادرات و واردات را تشکیل می دهد در اواخر سالهای ۱۹۵۰ میگوی خلیج فارس با کشتیهای صنعتی و سنتی و به وسیلهٔ تورهای صنعتی ترال، مورد بهره برداری قرار می گرفت و در سالهای ۶۸-۱۹۶۷ صید میگو به اوج خود یعنی ۱۷/۰۰۰ تن رسید اما درسالهای ۷۱-۱۹۷۰ به طور چشمگیری کاهش یافت و به حدود ۱۰/۰۰۰ تن در سال رسید. در سال ۱۹۸۵ این رقم حدود ۹/۰۰۰ تن (توسط فائو) اعلام گردید که عمدتاً از گونه پنئوس سمی سولکاتوس و پنئوس ایندیکوس در نواحی شمالی خلیج فارس و گونه متاپنئوس آفیننیس و پنئوس مرگوئنسیس در دریای عمان و خلیج فارس است (مجیدی نسب،۱۳۷۷) . بر اساس آمار منتشرشده از سوی سازمان شیلات ایران، میزان پرورش میگو در آب شور در سال

۲۰۰۶ (۵۷۰۰ تن) و در سال۲۰۰۷ (۲۵۰۸ تن) ،همچنین در سالهای مشابه میزان صید به ترتیب ۵۹۵۱ و ۷۴۵۰ تن گزارش شده است (سالنامه آماری شیلات، ۱۳۸۶).

انواع گونه های میگو :

میگوها گسترش جهانی دارند ، در دریاها ، آبهای لب شور، شیرین نواحی استوایی تا مناطق قطبی یافت می شوند. اکثر گونه های تجاری میگو که تکثیر و پرورش آنها در بسیاری از کشورهای دنیا صورت می گیرد از جنس پنئوس هستند که در آبهای گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا در عرض های جغرافیایی از ۴۰ درجه شمالی تا ۴۰ درجه جنوبی پراکنده هستند.

تقسیم بندی میگوها از نقطه نظر درجه شوری مکان زیست:

میگوهای دریازی (جنس پنئوس)

میگوهای آب شیرین (جنس ماکروبراکیوم)

تقسیم بندی میگوها از نقطه نظر درجه حرارت مکان زیست:

میگوهای آبهای سرد : درآبهایی به سر می برند که حداکثر درجه حرارت در فصل تابستان ۲۰ درجه است. مهمترین اقلام تجاری این گروه متعلق به خانواده پاندلیده است.

میگوهای آب گرم : درآبهایی به سر می برند که حداقل درجه حرارت در فصل زمستان ۲۰ درجه است. مهمترین اقلام تجاری این گروه ، گونه هایی هستند که در خلیج فارس و دریای عمان وجود دارند.

میگوهای آبها ی معتدل : درنواحی معتدل یافت می شوند و دامنه حررت مطلوب برای آنها ۲۰- ۳۰ درجه است. مانند میگوی چینی و ژاپنی

تقسیم بندی میگوها از نقطه نظر نحوهٔ زیست:

- گروه مهاجر یا سرگردان

- گروه خزنده یا حفار

تقسیم بندی میگوها از نظر چرخهٔ زندگی :

- میگوهای پلاژیک (Plago penaeus) که تمام چرخه زیستی آنها در دریاهاست.

- میگوهای که منحصراً در خورها هستند (Meta penaeus) .

- گونه هایی که در دریا تخم ریزی می کنند، نوزاد مراحلی از رشد و جنینی خود را در دریا به سرمی برد، سپس به خور مراجعت کرده و مراحل sub adult خود را در خور می گذراند. مثل *Penaeus merguensis*

- گونه هایی که در دریا تخم ریزی می کنند، مراحل اولیه رشد و نمو جنینی خود را در دریا به سرمی برد ، سپس به سواحل مراجعت کرده، مراحلی از رشد و نمو و تغذیه را در ساحل (نه خور) می گذراند و بعد به ساحل دریا باز می گردند. مثل *Penaeus semisulcatus*

از مهمترین گونه های تجاری ماکروبراکیوم می توان به گونه های *Macrobrachium American*(سواحل صخره ای– شنی کالیفرنیا تا پرو) ،*Macrobrachium carinus* (سواحل صخره ای – شنی فلوریدا تا برزیل) ، *Macrobrachium rosenbergii* (سواحل گلی– شنی ایندوپاسفیک) اشاره کرد (مجیدی نسب،۱۳۷۷).

۲-۱- پراکندگی جغرافیایی و محل زیست مهمترین گونه ها ی تجاری میگوهای پنئیده

میگوی سفید هندی *Fennero penaeus indicus*

مهمترین منطقه گسترش این میگو مناطق شمالی استرالیا، مناطق جنوبی گینه نو، سواحل غربی دریای چین جنوبی، خلیج سیام (تایلند)، مناطق شرقی جوامع اندونزی، مناطق شمالی و غربی جزایر مالزی، مناطق شرقی دریای آندامان، تمامی خلیج بنگال، دریای عربی، دریای عمان، خلیج فارس، دریای سرخ، سواحل شرقی قاره آفریقا، و اطراف جزایر ماداگاسکار است(Benzie 2009). بدن این میگو شیری رنگ است تعداد خارهای بالایی روستروم آن ۹-۷عدد و در پایین روستروم ۴-۳عدد است. میگوی بسیار کم مقاومتی است و در پرورش و صید تلفات زیادی دارد. حداکثر طول درنرها ۱۸ سانتی متر و در ماده ها ۲۳ سانتی متر است(عابدیان،۱۳۸۵) ، صید جهانی آن حدود ۱۵۰۰۰۰ تن است و پرورش آن در سال ۲۰۰۰ ، ۴۳۷۰ تن بوده است از این مقدار ۷۹/۵٪

مربوط به ویتنام، ۹/۹٪ عمان و ۶/۹٪ هند بوده است. در جه حرارت بهینه برای رشد ۲۳-۲۲ درجه سانتیگراد است (عمادی، ۱۳۸۴).

میگوی موزی ***Fenoro penaeus merguensis***

مهمترین منطقه گسترش این میگو ایندو پاسفیک غربی، از خلیج فارس تا تایلند ، هنگ کنگ ، فیلیپین ، اندونزی، گینهٔ جدید ، اسکاندیناوی جدید ، غرب، شرق و شمال استرالیا می باشد. رنگ بدن این گونه صورتی تا زردکم رنگ گاه سبز متمایل به خاکستری است که به نوع بستر و غذا بستگی دارد. علت نام گذاری به نام موزی این است که بدن میگو خالهای کوچکی دارد که شبیه موزاست. از مناطق ساحلی تا عمق ۵۵ متری زندگی می کنند ولی بیشترین تراکم آن در عمق ۲۰ متری است .گله های بزرگی دارد که شب و روز در حال حرکتند. حداکثر طول نرها 19.5cm و ماده ها 24cm است. تعداد خارهای بالایی روستروم ۸-۷ تا و در پایین ۶-۵ تاست. بهترین درجه حرارت برای پرورش ۳۲-۲۵ درجه سانتیگراد و شوری مناسب۱۵-۳۲ ppt است (عابدیان،۱۳۸۵). صید جهانی این گونه حدود ۸۰ هزار تن است. در سال ۲۰۰۰ پرورش جهانی آن ۴۵/۷۱۷ تن بوده است اندونزی ۶۰٪ تولید، ویتنام ۳۰/۴۲٪ و تایلند ۶/۶٪ تولید آن را شامل می شود(عمادی، ۱۳۸۴).

میگوی ببری سبز ***penaeus semisulcatus***

مهمترین منطقه گسترش این میگو ایندوپاسفیک غربی: از سواحل شرقی تا افریقا تا دریای سرخ ، خلیج فارس تا هند ، ژاپن ، تایلند، شمال استرالیا ، سواحل مدیترانه شمال مصر، اسراییل و سوریه است. از مناطق ساحلی تا عمق ۱۳۰ متری پیدا می شود ولی بیشترین تراکم آن درعمق ۶۰متری است. گله های کوچکی دارند هم شب و هم روز می توان آنها را صید کرد.رنگ بدن این گونه سبز متمایل به خاکستری تا زیتونی است. روی بدنش باندهای رنگی اریبی وجود دارد و این رنگ آمیزی حتی روی روستروم نیز دیده می شود. فرمول روستروم آن در بالا ۷-۸ و در پایین ۳ عدد است . ولی از روی باندهای رنگی می توان میگوی سفید هندی را از میگوی ببری سبز تشخیص داد. حداکثر طول نرها۲۰ و ماده ها ۲۴ سانتی متر است(عابدیان،۱۳۸۵).

میگوی ژاپنی ***Marsu penaeus japonicus***

مهمترین منطقه گسترش این میگو ایندوپاسفیک غربی ، از شرق و جنوب شرق افریقا تا کره و ژاپن به طرف جنوب اندونزی ، شمال و شمال شرق استرالیا به طرف غرب تا فیجی است، این گونه به دریای مدیترانه وارد شده و از طریق کانال سوئز به سواحل جنوبی ترکیه رسیده است. از مناطق ساحلی تا عمق ۹۰ متری زندگی می کنند و بسترهای ماسه ای یا گلی- ماسه ای را ترجیح می دهند رنگ بدنشان عمدتا قهوه ای روشن، قهوه ای متمایل به سبز با باندهای قهوه ای رنگ که بعضا ممکن است باندها از رنگ زمینه بدن روشن تر یا تیره تر باشد . طول نرها۱۹ و ماده ها۲۲ سانتی متر است .فرمول روستروم آن در بالا۱۰-۸ و در پایین ۲-۱ عدد است و روی روستروم نیز باندهای رنگی دارد(عابدیان،۱۳۸۵) . علی رغم این که اولین میگوی پرورش جهان است زیاد پروش داده نمی شود در سال۱۹۹۱ میزان پرورش آن ۱۴۰۰۰ تن ، درسال ۹۶، ۲۸۰۰ تن بوده وصید آن حدود ۱۲۰۰۰ تن است. درجه حرارت اپتیموم برای پرورش ۲۸-۱۸ درجه سانتیگراد و شوری بهینه ۳۵ تا۴۵ ppt است(عمادی، ۱۳۸۴).

میگوی چینی ***Fenoro penaeus chinensis(orientalis)***

مهمترین منطقه گسترش این میگو ایندوپاسفیک غربی ، چین ، هنگ کنگ ، کره می باشد. در اعماق ۹۰تا ۱۸۰متری زندگی می کنند(عمادی، ۱۳۸۴).

میگوی ببری سیاه ***penaeus monodon***

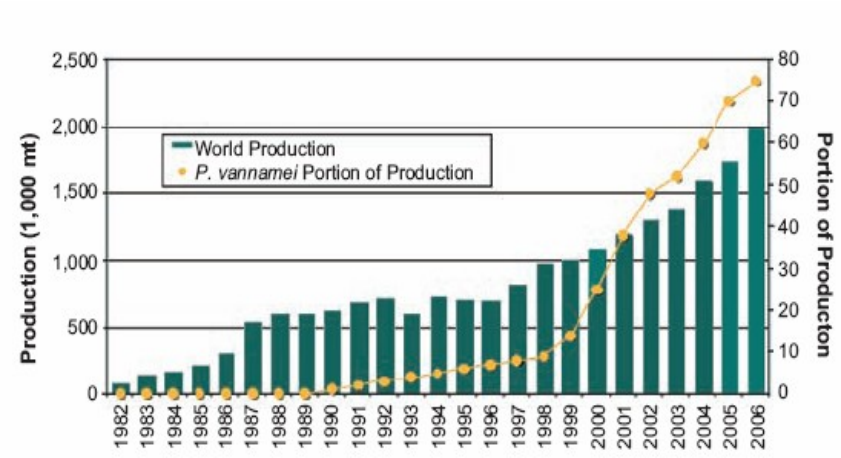
مهمترین منطقه گسترش این میگو ایندوپاسفیک غربی ، شرق و جنوب شرقی افریقا و پاکستان تا ژاپن به طرف جنوب تا اندونزی و شمال استرالیا است. رنگ آن تیره و معمولا سیاه ، شکم دارای باندهای اریب است و پیگمان های زیادی دارد. از سواحل تا عمق ۱۵۰ متری زندگی می کند ولی بیشترین تراکم آن درعمق ۶۰ متری است. بسترهای شنی و ماسه ای و مخلوطی از شن و ماسه و خرده صدف ها را دوست دارد در خورها و جنگلهای حرا یافت می شوند. طول نرها تا ۲۶/۸ و ماده ها تا ۳۳/۷ سانتی متر می رسند در پرورش وزنشان تا ۱۵۰gr می رسد و در آب های دور تا ۶۰۰ gr نیز صید می شوند، صید جهانی آن حدود ۶۰ هزار تن و پرورش آن

در سال ۱۹۹۵ ، ۵۸۴ هزار تن و در سال ۲۰۰۰، ۵۷۲/۵ هزار تن بوده است از بین این مقدار تایلند ۵۱/۶٪، اندونزی۱۵/۸٪، و هند ۹/۲٪ و ویتنام ۹/۱٪ ، فیلیپین۷/۱٪، و مالزی ۲/۷٪ است. درجه حرارت اپتیموم برای پرورش ۳۴-۲۴ درجه سانتیگراد و شوری مناسب آن۲۵-۵ppt است. با Gill net ، Trawl و پره های ساحلی و انواع قفس آن را صید می کنند(عمادی، ۱۳۸۴). همانطوریکه در جدول ۲ مشاهده می شود مقایسه پارامترهای اقتصادی پرورش دو گونه میگوی *Peneaus vannami* و *Peneaus monodon* نشان می دهد که میگوی وانامی در پرورش سود آورتر است همچنین در نمودار ۲ مشاهده می شود که میزان پرورش این گونه از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۶ روند افزایشی داشته است.

میگوی پا سفید غربی ***Lito penaeus vanamei***

مهمترین منطقه گسترش این میگو ایندوپاسفیک شرقی : از شمال مکزیک تا جنوب و شمال پرو می باشد. این میگو از نوع میگوهای سرگردان است. تا سال ۲۰۰۲ دومین میگوی پرورشی بود. در سال ۲۰۰۲ تولید جهانی آن ۱۴۳/۷۳۷ تن بوده که از این میان ۳۴/۹٪ مربوط به اکوادور، ۲۳/۳٪ مکزیک، ۱۷/۴٪ برزیل، ۷/۹٪ کلمبیا، ۵/۷٪ ونزوئلا و ۳/۶٪ مربوط به نیکاراگوآست. زادگاه این میگو اطلس شرقی (ازمکزیک تا پرو) است. صید سالانه آن حدود ۲۳۳ تن و پرورش آن در سال ۱۹۸۸ ، ۷۵/۹۳۱ تن بوده است. روش پرورش به دوصورت متراکم و هم غیرمتراکم است. بهترین درجه حرارت برای پرورش این گونه ۳۳-۲۶ سانتی گراد و شوری مناسب ۵-۳۵ppt است. درعرض ۵-۲ ماه، به ۷ تا۲۳ گرم می رسد. در سیستم پرورش غیرمتراکم۵۰۰ kg/ha ولی در سیستم متراکم، تا ۳تن در هکتار یا بیشتر تولید خواهیم داشت. با توجه به مزایای پرورش میگوی سفید هندی نسبت به ببری سیاه (جدول ۲)، بسیاری از کشورها این گونه را در ردیف اول فهرست انواع پرورشی قرار داده اند(جدول ۳).

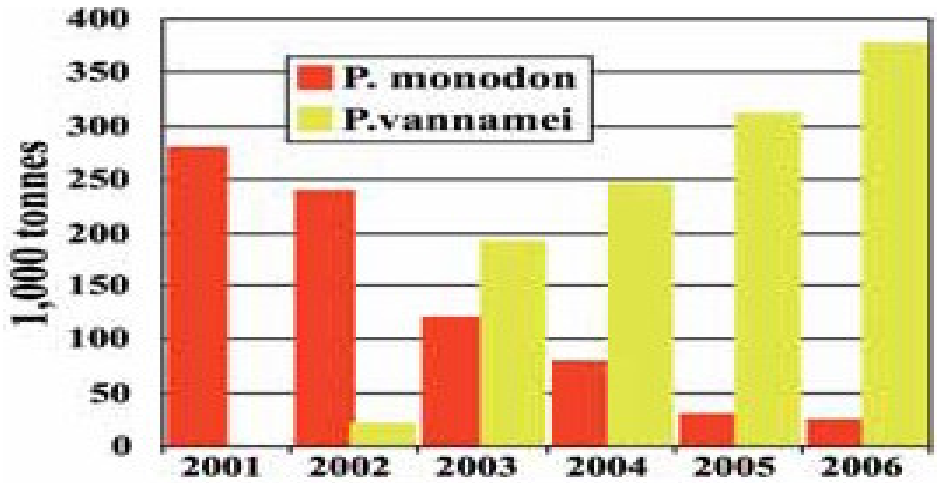
نمودار ۱. تغییرات تولید میگوی وانامی طی سالهای۲۰۰۶ -۱۹۸۲
(ماخذ: افشار نسب، ۱۳۸٦)



جدول۲. مقایسه پارامترهای اقتصادی پرورش دو گونه میگوی *Peneaus vannami* و *Peneaus monodon* (ماخذ: افشار نسب، ۱۳۸٦)

پارامتر	*p.monodon*	*p. vannamei*	٪ تفاوت
تراکم(پست لارو در متر مربع)	۴۰-۵۰	۱۲۰-۲۰۰	٪۳۰۰
دوره تولید (روز)	۱۱۰-۱۴۰	۱۰۵-۱۲۰	٪۲۷
سایز برداشتی(گرم)	۲۲-۲۸	(42/kg)	٪۵
محصول (تن در هکتار)	۸	۲۴	٪۳۰۰
ارزش محصول (دلار آمریکا / هکتار)	۴۵۰۰۰	۹۶۰۰۰	٪۲۲۰
قیمت محصول (دلارامریکا/هکتار)	۳۲۰۰۰	۶۰۰۰۰	
سود تولید (دلارامریکا/هکتار)	۱۳۰۰۰	۳۶۰۰۰	٪۲۸۰

نمودار۲. مقایسه میزان تولید دو گونه میگوی *Peneaus vannami* و *Peneaus monodon* طی سالهای ۲۰۰٦- ۲۰۰۱ (ماخذ: افشار نسب، ۱۳۸٦)



جدول ۳. مقایسه هزینه تولید میگوی ببری سیاه و سفید غربی در کشورهای مختلف در سال۲۰۰۷(Briggs, M. *etal*,۲۰۰٤).

کشور	میزان تولید در هر دوره تولید (تن در هکتار)		هزینه تولید یک کیلوگرم میگو(دلار)	
	میگوی ببری سبز	میگوی سفید غربی	میگوی ببری سبز	میگوی سفید غربی
چین	کمتر از ۷	۷ تا ۱۱	۲	۲
تایلند	۳	۶ تا۷	۳/۱	۲/۱۴
ویتنام	۴ تا۵	۴ تا۷	–	–
فیلیپین	۵ تا۸	۴	۳/۴	۱/۸۹
اندونزی	۱ تا۳	۳ تا۵	–	–
مالزی	۱٫۵ تا۹	۵ تا۱۲	۴/۲۷	۳/۶۳

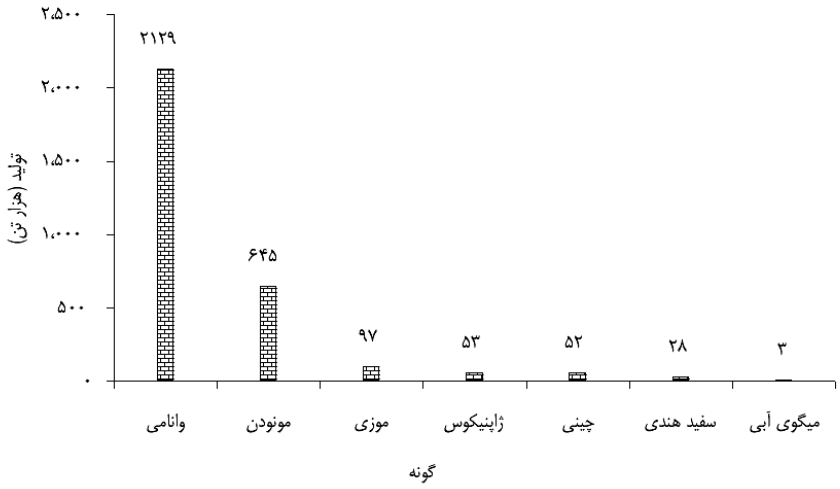
ایران میانگین تولید میگوی سفید غربی در هر دوره تولید (تن در هکتار):۲/۲ هزینه تولید یک کیلوگرم میگو(دلار):۲/۸

میگوی آبی *Lito penaeus stylirostris*

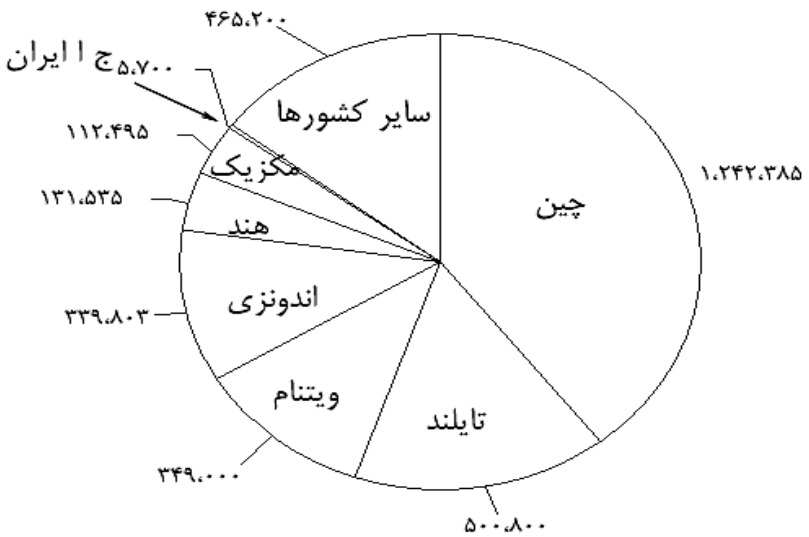
مهمترین منطقه گسترش این میگو ایندوپاسفیک شرقی ازشمال مکزیک تا جنوب و شمال پرو می باشد. در جه حرارت مناسب برای پرورش این گونه ۳۰-۲۲ درجه سانتیگراد و شوری مناسب۲۵-۳۰ ppt است. در سال ۱۹۹۶ پرورش جهانی آن ۱۰/۹۴۱ تن بود ولی در سال ۱۹۹۸، به علت جایگزینی این گونه با گونه *p.vannamei* به ۸/۳۶۲ تن رسید (متین فر،۱۳۸۶).

میگوی روغنی *meta penaeus ensis*

پراکنش این گونه در ایندو پاسفیک غربی، سری لانکا و مالزی تا جنوب شرقی چین، ژاپن به طرف جنوب تا اندونزی، گینه جدید، غرب، شمال و شرق استرالیا می باشد. در اعماق ۱۸ تا ۶۴ متری و در بسترهای گلی زندگی می کند(عمادی،۱۳۸۴).



نمودار۳- میزان تولید میگوی پرورشی جهان بر حسب گونه در سال ۲۰۰۶



نمودار٤. میزان تولید میگوی پرورشی کشور های پیشرو در سال ۲۰۰٦.

میگوهای ایران

تا کنون ۱۸ گونه میگو در خلیج فارس و دریای عمان شناسایی شده اند که بهره برداری از سه گونه میگوی ببری سبز ، موزی و سفید در مقیاس تجاری صورت می گیرد . بیشترین پراکنش و صید متعلق به گونه ببری سبز است که سهم عمده ای در صادرات میگوی ایران دارد.

گونه هایی که قابلیت تکثیر و پرورش دارند نیز انواع زیر شامل می شوند:

- میگوی ببری سبز *penaeus semisulcatus*

-میگوی موزی *Fenoro penaeus merguensis*

-میگو ی سفید هندی *Fenoro penaeus indicus*

-میگوی دم قرمز *Fenoro penaeus penisulcatus*

-میگوی ژاپنی *Marsu penaeus japonicus*

-میگوی سفید *Meta penaeus affinis*

از بین انواع فوق میگوی دم قرمز و میگوی ژاپنی فراوانی بسیار کمی دارند، از این رو در ایران به عنوان یک گونه پرورشی تاکنون کمتر مورد توجه قرارگرفته اند. علاوه بر این گونه ها ، گزارشات محدودی از وجود گونه معروف پرورشی یعنی ببری سیاه در آبهای ناحیه خلیج گواتر(استان سیستان و بلوچستان) در دست است ولی هنوز اطلاعات دقیقی درباره این میگو و میزان ان وجود ندارد. پراکنش جغرافیایی این گونه ها در سواحل جنوبی خلیج فارس و دریای عمان کمی متفاوت است.به طوری که میگوهای ببری سبز، سفید ، ژاپنی بیشتر در آب های خلیج فارس (استانهای خوزستان و بوشهر) به سر می برند و میگوهای سفید هندی ، دم قرمز و موزی عملاً در ابهای دریای عمان (استانهای هرمزگان و سیستان و بلوچستان) پراکنده هستند(مجیدی نسب،۱۳۷۷).

جدول٤ .میزان تولید میگوهای دریای و پرورشی طی دهه ٔ اخیر(تن) ،(ما ٔخذ: متین فر، ١٣٨٦)

نظام تولید	١٣٧٦	١٣٧٧	١٣٧٨	١٣٧٩	١٣٨٠	١٣٨١	١٣٨٢	١٣٨٣	١٣٨٤	١٣٨٥	١٣٨٦
صید	۷۶۲۰	۵۷۷۴	۴۵۷۰	۹۸۵۰	۶۹۴۰	۵۷۲۶	۷۱۰۰	۵۹۴۰	۹۱۲۸	۵۹۵۱	-
پرورش	۵۲۳	۸۶۹	۱۸۰۰	۴۰۱۰	۷۶۳۰	۵۹۹۰	۷۴۹۲	۸۹۳۰	۳۸۴۵	۵۶۹۹	۲۴۰۰

جدول ٥.صید میگو در استانهای جنوبی کشور در دهه ٔ اخیر (تن)

سال / استان	۱۳۷۵	۱۳۷۶	۱۳۷۷	۱۳۷۸	۱۳۷۹	۱۳۸۰	۱۳۸۱	۱۳۸۲	۱۳۸۳	۱۳۸۴
خوزستان	۸۷۵	۹۸۰	۱۳۳۱	۱۴۴۰	۴۲۸۰	۲۷۶۰	۱۵۰۰	۱۸۰۵	۱۸۰۰	۱۹۵۱
بوشهر	۳۱۵۹	۱۷۶۵	۲۶۴۹	۶۵۰	۳۲۰۰	۲۲۵۰	۱۵۰۶	۳۱۳۲	۲۲۸۴	۱۹۵۶
هرمزگان	۱۸۴۵	۴۸۷۵	۱۷۹۴	۲۴۸۰	۲۳۷۰	۱۹۳۰	۲۷۲۰	۲۱۵۷	۱۷۷۶	۵۱۱۷
سیستان و بلوچستان	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۶	۸۰	۱۰۴

۳-۱- تاریخچهٔ پرورش میگو در جهان و ایران

پرورش سنتی میگو با وارد شدن لارو و بچه میگوها به حوضچه های تولید نمک در کشور اندونزی آغاز شده است. در سالهای بعد که پرورش خامه ماهی مورد وجه قرار گرفت، میگو به عنوان یک محصول جانبی برای تولید خامه ماهی به حساب می آمد. پی بردن به ارزش غذایی سخت پوستان و دست یابی به دانش تکثیر میگو در شرایط اسارت طی سالهای ۱۹۵۰-۱۹۳۴ توسط فوجی ناگا ی ژاپنی، زمینه توسعهٔ میگوی پرورشی را فراهم آورد (شیگوانو ۱۹۷۵) وی لارو میگوی پنئوس ژاپونیکوس را پرورش داد و به مرحلهٔ پست لاروی رساند و برهمین اساس در سال ۱۹۴۲ نخستین گزارش پرورش میگو را ارایه کرد. با آغاز جنگ جهانی و مشکلات ناشی از آن این فعالیت چند سالی متوقف شد ولی فوجی ناگا مجدداً در سال ۱۹۶۳ کار را دنبال کرد و در سالهای ۶۵-۱۹۶۴ موفق شد تولید انبوه میگوی پنئوس ژاپونیکوس را با موفقیت به انجام برساند. وی به همراه دستیارش در سال ۱۹۶۷ گزارش کامل چگونگی تولید انبوه لارو میگو را انتشار داد.

در بین کشورهای جنوب شرقی آسیا، تایلند تنها کشوری است که پرورش تک گونه ای میگو را تا حد زیادی توسعه داده است. کشورهای فیلیپین و اندونزی هم برنامهٔ مشابهی را در پیش گرفته اند و همچنین تایلندی ها از پنئوس مونودون و متاپنئوس انسیس و به جای گونه پنئوس ایندیکوس از پنئوس مرگوئنسیس استفاده می کنند.

نوع جامع و وسیعتر پرورش میگو در کشورهای سنگاپور و مالزی و در حوضچه های تله ای انجام می گیرد. هند جزو کشورهایی است که پرورش میگو در نواحی بسیار وسیعی از آن انجام می شود از جمله در مزارع برنج که با این روش کشت دو منظوره سود قابل توجه عاید کشاورزان می شود.

در آمریکای لاتین مزارع پرورش میگو را می توان در کشورهای مکزیک، پاناما، کاستاریکا و اکوادور مشاهده کرد. پرورش میگو در این کشورها از مبنای محکمی برخوردار است و تاریخ آغاز فعالیتهای انجام شده در پرورش میگو به سالهای دهه ۱۹۶۰ باز می گردد.

در کشورهای پرو و اکوادور عمدتاً از پنئوس استیلی روستریس در مرداب هایی که درجه شوری آنها نزدیک به درجه شوری آب دریاست و پنئوس وانامی در مرداب هایی که درجه شوری کمتری دارند استفاده می شود.

با رشد سریع و فوق العادهٔ تجهیزات و امکانات و دارا بودن کارشناسان برجسته در چند کشور از جمله ژاپن، چین و آمریکا گویی سا ل های بسیاری از عمر تکثیر و پرورش میگو می گذرد. در حالی که این همه پیشرفت

درامر تکثیر و پرورش میگو در کمتر از ۳۰ سال به دست آمده است در این زمینه می توان به چهار عامل مهم اشاره کرد:

۱-وجود پروتئین سرشار و مواد معدنی بی نظیر در گوشت میگو

۲-کوتاه بودن زمان تکثیر و پرورش و امکان تولید بچه میگو به تعداد انبوه

۳-تقاضای روزافزون جهانی برای مصرف مواد پروتئینی

۴-ارز آور بودن فروش لارو زنده و میگوی بالغ

در ایران نیز اولین اقدامات های تکثیر و پرورش میگو در قالب پروژه های تحقیقاتی در موسسه تحقیقاتی شیلات ایران به عمل آمد و مرکز تحقیقات بوشهردرسالهای ۱۳۶۴-۱۳۶۳ اولین تجارب علمی تکثیر و پرورش میگو در شرایط آزمایشگاهی را رقم زده است(مجیدی نسب،۱۳۷۷).

در سال ۱۳۶۵ گروه چینی وارد ایران شده، اقدامات ابتدایی را در زمینه پرورش میگو در کارگاه کلاهی انجام دادند، اولین مجتمع پرورشی در سال ۱۳۶۷ در آبادان ساخته شد. در سال ۱۳۶۹ اولین محموله میگوی مونودون وارد ایران شد، در همین سال پست لارو میگوی رزنبرگی نیز وارد ایران گردید و اولین بهره برداری در سال ۱۳۷۱ انجام گرفت. با کشف ذخایر میگوی سفید هندی درآبهای ساحلی دریای عمان (حوالی بندر جاسک)، این گونه به عنوان میگوی اصلی پرورشی ایران نقش اصلی را در تولید ایفا نمود. بروز بیماری لکه سفید در سال ۱۳۸۱ در خوزستان و در سال ۱۳۸۴ در بوشهر و تأکید برنامه چهارم توسعه شیلات ایران از سال ۱۳۸۳ فعالیت خود را برروی میگوی پا سفید آغازنمود، که دستآوردهای آن، پرورش دهندگان را به این گونه بیشتر متوجه کرد. میگوی وانامی به دلیل ویژگی های خاص خود و برتری های بیولوژیک درحال حاضر به عنوان گونهٔ اول پرورشی در جهان محسوب می شود. در مورد این گونه که عملاً از سال ۱۳۸۵ وارد چرخهٔ تولید میگوی پرورشی گردید، تا کنون تأمین مولدین آن متکی به واردات از خارج کشورمی باشد. تلاش هایی توسط مؤسسهٔ تحقیقات شیلات ایران برای مولد سازی و تأمین مولدین از بین میگوهای پرورشی در دست اقدام است، که انتظار می رود طی سالهای آتی بتوان بخش قابل توجهی ازمولدین میگوی وانامی را داخل کشور تأمین نمود(متین فر،۱۳۸۶).

روشهای پرورش میگو

روشهای پرورش میگو عبارتنداز:

۱-پرورش گسترده یا طبیعی (Extensive Culture)

۲-پرورش نیمه متراکم (Semi intensive Culture)

۳-پرورش متراکم (Intensive Culture)

۴-پرورش فوق متراکم (Super-intensive Culture)

۵-پرورش در قفس (Cage Culture)

بروز و شیوع بیماریهای میگو بستگی به سیستم پرورش و کیفیت مدیریت اعمال شده در طول پرورش دارد. در تمام سیستمهای متراکم و اکثر سیستمهای نیمه متراکم، شناسایی و پیشگیری از بیماریها و درمان برخی از آنها امکان پذیر است. در سیستمهای غیرمتراکم درمان بیماریها حتی اگر قابل تشخیص باشد غیراقتصادی و غیرعملی است. در سیستمهای متراکم و نیمه متراکم به علت زیادی تعداد میگو در واحد سطح و تراکم آن، شیوع و انتشار بیماریها به سرعت رخ می دهد. به خاطر حساسیت زیاد لاروها و بچه میگوها به عوامل عفونی و غیرعفونی بروز بیماریها بسرعت رخ می دهد و با تلفات سنگین در آنها معمولا بسیار شایع است برای کنترل بیماریها در این گونه تفریخ گاه ها از مواد شیمیایی استفاده می کنند.

بیشترداميزشکان متخصص بیماریهای آبزیان عقیده دارند که با اصلاح شرایط محیطی و بویژه با کنترل کیفیت آب می توان از بروز بسیاری از بیماری ها جلوگیری کرد در استخرهای پرورش نیز استفاده از دارو به خاطر حجم زیاد آب و گران بودن دارو، اقتصادی نخواهد بود. از طرفی ممکن است به علت عکس العمل متقابل برخی از مواد و موجودات زنده آب اثر دارو و مواد شیمیای خنثی و یا حتی زیان بار گردد. بنابراین بهتر است که با اصلاح شرایطی محیطی و ایجاد فضای حیاتی مناسب تر از بروز و شیوع بیماریها در استخرها جلوگیری کرد.

پرورش گسترده (Extensive Culture)

لاروها از غذای طبیعی استفاده کرده و هیچگونه تغذیه دستی انجام نمی شود و مواد غذایی به همراه جریان آب وارد استخرهای پرورش می شوند. برداشت محصول حدود ۱۵۰ تا ۵۰۰ کیلوگرم در هکتار دوره پرورش یک بار در سال و تراکم لاروها بسیار کم و بین ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ در هکتار است که معمولاً کمتر از ۲/۵ پست لارو در هر مترمربع محاسبه می شود.

پرورش نیمه متراکم (Semi intensive Culture)

بخشی از نیازهای غذایی لاروها از محیط طبیعی و بخشی هم به وسیله غذاهای تجاری به عنوان مکمل غذایی تأمین می شود. از کود هم جهت بارور کردن استخر استفاده می شود روزانه به نسبت دو تا ده درصد حجم استخر، آب به خارج پمپاژ و تعویض می شود.

مقدار تولید در هر هکتار و هر دوره پرورش حدود ۶۰۰ تا ۱۲۰۰ کیلوگرم است. تعداد برداشت سالانه با توجه به شرایط محیطی ۲/۵ بار است ولی معمولا دو برداشت محصول در سال و به ترتیب زیر صورت می گیرد:

الف-برداشت اولیه یا اصلی از دوره پرورشی، فروردین تا مرداد

ب-برداشت ثانویه یا فرعی از دوره پرورشی، مرداد تا اسفند

تراکم لاروها د راین روش بیشتر و بین ۲۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ پست لارو در هکتار یا ۳ تا ۱۰ عدد در هر مترمربع می باشد.

پرورش متراکم (Intensive Culture)

تمام نیازهای غذایی میگو از طریق غذاهای تجاری، کنسانتره و کوددهی برآورده می شود میزان تولید در هر هکتار و هر دوره پرورش حدود ۲۰۰۰ تا ۹۰۰۰ کیلوگرم است. روزانه آب به مقدار ۵۰٪ تعویض می شود و معمولادر این روش هوادهی صورت می گیرد تراکم لارو بسیار بالا و بین ۱۰۰۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰۰ پست لارو در هکتار یا ۲۰ تا ۴۰ عدد درهر مترمربع است.

پرورش فوق متراکم (Super-intensiv Culture)

این روش در مناطقی که مساله کمبود آب و زمین مطرح است به کار می رود و آب پیوسته تصفیه و فیلتر می شود. استخرها به گونه ای طراحی شده اند که ارتفاع آنها بیش از طول آنهاست و کلیه نیازهای غذایی با کنسانتره کامل برآورده می شود. هوادهی به صورت مداوم انجام شده ، روزانه ۳۰۰ تا ۱۱۰۰ بار آب تعویض و فیلتر می گردد.مقدار تولید درهرهکتار و هر دوره پرورش حدود ۲۴۰۰۰ کیلوگرم است. تراکم لارو فوق العاده بالا و حدود ۱۶۰ پست لارو در هرمترمربع است.

پرورش در قفس (Cage Culture)

یکی از روشهای نسبتاً جدید پرورش میگو در جهان است هر چند این روش در برخی از کشورها نظیر هند و فیلیپین به کار می رود ولی به خاطر وجود مشکلاتی هنوز به طور کامل جایگزین روشهای پیش بینی شده است امروزه روشهای مختلفی برای پرورش در قفس مورد استفاده قرار می گیرد و هنوز روش ایده آلی به دست نیامده است به طور کلی دوسیستم پرورش در قفس وجود دارد:

الف-قفسهای ثابت

ب-قفسهای شناور یا متحرک (افشارنسب،۱۳۸۶)

اهمیت میگوی سفید هندی برای ایران

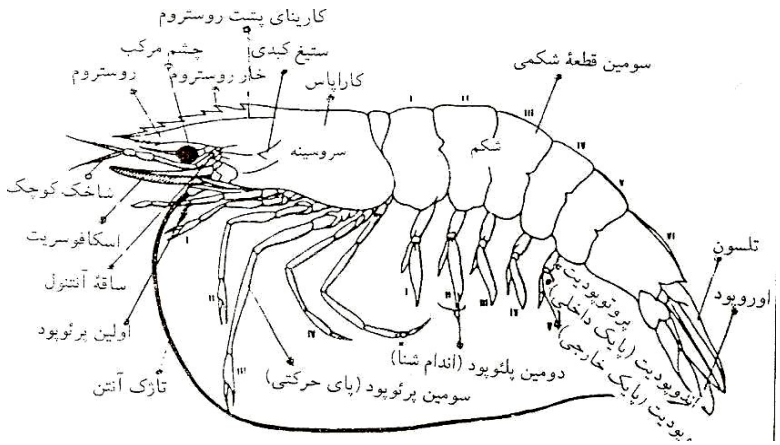
توسعهٔ آبزی پروری به ویژه میگوی پرورشی نقش مهمی در افزایش تولید مواد غذایی سالم و افزایش سهم آبزیان در سبد غذایی جامعه، افزایش اشتغال، ارزآوری و توسعه روستایی در مناطق جنوب ایفا می کند. بدون شک توسعهٔ پایدار و رسیدن به اهداف برنامه های تولیدی بدون توجه به اقتصاد تکثیر و پرورش و جایگاه ویژه در بازارهای داخلی و بین المللی امکان پذیر نخواهد بود. با توجه به توان و استعداد مناطق جنوبی ، دما، شوری ،PH مناسب آب و خاک ، پرورش این گونه، اقتصادی به نظر می رسد، از طرفی تولید بیشتر و عمل آوری مناسب ابن گونه و ایجاد محصولاتی همچون انواع کنسروها و ورود به بازار مصرف داخل، می تواند جایگزین آیزیان وارداتی در سبد مصرف خانوارهای ایرانی شده که این امر از خروج ارز از کشور جلوگیری می نماید از

سویی تولید محصولات باکیفیت بالا امکان رقابت با سایر کشورهای صادر کننده، به دست گرفتن بازار های منطقه و حتی جهان و در نتیجه ارزآوری برای کشورعزیزمان را فراهم خواهد آورد. که در این راستا احداث کارخانه های فرآوری نیز کمک زیادی به اشتغال زایی خواهد نمود. اگر چه وجود استعدادهای طبیعی، افزایش قیمت دلار و مزایای بالقوه اقتصادی- اجتماعی ناشی از گسترش میگو موجب گردید تا طی یک دهه گذشته توسعه پرورش میگو در ایران به عنوان یکی از اولویت های برنامهٔ دوم، سوم و چهارم توسعه، در زیر بخش شیلات مطرح شود ولی این امرحمایت بیشتر سازمان های دولتی و غیر دولتی و وجود یک ساختار مناسب تحقیق ، ترویج و آموزش را می طلبد.

عموما سودآوری مهمترین انگیزهٔ تجاری برای مصرف داخلی یا برای صادرات است و تحلیل اقتصاد تولید برای ارزیابی بقا و تداو م سرمایه گذاری در آبزی پروری امری اساسی می باشد. اگر پرورش دهنده نتواند تولید اقتصادی داشته باشد لزوما می بایست از گردونه خارج شود که این اتفاق برای تعدادی از پرورش دهندگان میگوی ایران، بعد از کاهش قیمت جهانی میگو در سال ۲۰۰۱ و بیماری لکه سفید و سرمازدگی اتفاق افتاده است و هنوز هم ادامه دارد.

٤-۱- ریخت شناسی (مرفولوژی)

میگوها گروه بزرگی از سخت پوستان را تشکیل می دهند که اندازه آنها از ابعاد میکروسکوپی تا ۳۵ سانتی متر متغیر است. هر چند تا به حال نزدیک به ۲۵۰۰ گونه از آنها شناسایی شده ولی کمتر از ۳۰۰ گونه از نظر اقتصادی مورد توجه هستند و قسمت اعظم صید در دنیا مربوط به ۱۰۰ گونه میگو است.



تصویر۱.نمای کلی بدن یک میگو

جدول۵. اندامهای میگو و عمل هر کدام از آنها(عابدیان،۱۳۸٤)

سر	عمل	سینه	عمل	شکم	عمل
۱- انتنول	تعادل، لمس، چشیدن(حس کردن)	۱-اولین پای فکی	لمس کردن		انتقال اسپرم از میگوی نر به ماده
۲-انتن	لمس کردن ، حس کردن	۲- دومین پای فکی	حس کردن (چشیدن)	۱- اولین پای شنا	انتقال اسپرم از میگوی نر به ماده
۳- اولین آرواره بالا	نگهداری غذا	۳- سومین پای فکی	نگه داشتن		
		۴- اولین پای حرکتی	دفاع، گرفتن مواد غذایی، حرکت	۲- دومین پای شنا	به جریان انداختن آب در هر دو جنس نر وماده، حمل تخمها در میگوی ماده
۴- دومین آرواره بالا	نگهداری و هدایت غذا به طرف دهان	۵- دومین پای حرکتی	حرکت، چنگ زدن،کمک در تغذیه	۳- سومین پای شنا	
		۶- سومین پای حرکتی	حرکت کردن		شنا کردن
۵- ارواره پایینی		۷- چهارمین پای حرکتی	حرکت کردن	۴- چهارمین پای شنا	
	خرد کردن غذا	۸- پنجمین پای حرکتی	حرکت کردن	۵- پنجمین پای شنا	شنا کردن
				۶- اوروپود	شنا کردن،حفاظت تخمها در جنس ماده

آناتومی

سرو سینه(Cephalothorax)

از قسمتی به نام کاراپاس (Carapace) تشکیل شده که یکپارچه است وسطوح پشتی و جانبی را مانند سپری حفاظت می کند روی کاراپاس یک شیار عرضی وجود دارد که حد واسط سر و سینه را مشخص می کند و برای تقسیم بندی و تشخیص گونه های مختلف میگو از آن استفاده می شود.

در انتهای قدامی بدن زایده ای نوک تیز به نام روستروم (Rustrum) قرار گرفته که در لبه های بالایی و پایینی آن دندانه های رو به جلو مشاهده می شود و به عنوان کلید تشخیص انواع گونه ها به کار می رود زیر روستروم ودر هر طرف بدن یک چشم مرکب پایه دار متحرک (Opthalmopod) قرار دارد.

دهان میان آرواره بالایی واقع شده و در ناحیه سر یک جفت آنتن (Antenna)، یک جفت آنتنول(Antennula) ، دو جفت آرواره یا فک فوقانی (Maxilla)، یک جفت آرواره یا فک تحتانی (Mandible) و یک جفت صفحه پولک مانند آنتنی یا اسکافوسریت (Scaphocerite) دیده می شود آنتنول ها کوچک، ولی آنتن ها بلند و طویل هستند. این دو عنصر متحرک، اندام حسی میگو را تشکیل داده، تحریکات مختلف محیطی را دریافت می کنند.

سه جفت اول ضمایم سینه ای را پاهای آرواره ای یا فکی (Maxilliped) می گویند(عابدیان،۱۳۸۴).

شکم(Abdomen)

قسمت خلفی بدن میگوها را شکم می گویند که از شش بند تشکیل شده ودر انتهای بدن به دو جفت اوروپود (Uropods) و قطعه ای میانی به نام تلسون (Telson) ختم می شود. اوروپودها و تلسون با یکدیگر دم بادبزنی یا باله دمی (Fan tail) را تشکیل می دهند که وظیفه آنها کمک به شنای جانور است مخرج (Anus) در ششمین بند و در سطح زیرین تلسون باز می شود.

قسمتهای تشکیل دهنده اسکلت خارجی یک بند عبارتنداز:

الف-یک قسمت پشتی به نام قطعه پشتی (Tergum)

ب-دو قسمت جانبی به نام پلرون (Pleuron)

ج-یک قسمت شکمی به نام قطعه سینه ای یا جناغی (Sternum)

ضمایم بندهای بدن از قسمتهای متعددی تشکیل یافته که ازلحاظ تعداد ساختمان و عملکرد با یکدیگر متفاوتند ولی در طرح ساختمانی ضمایم نشانه منظمی دیده می شود و هر یک از ضمایم دارای یک قسمت قاعده ای به نام پروتوپودیت (Protopodite) بوده و خود معمولا از دوبند دیگر یعنی بند اول یا کوکسا (Coxa) و بند دوم یا بیس (Basis) تشکیل شده اند. بند دوم دارای اندوپودیت (Endopodite) میانی و اگزوپودیت (Exopodite) جانبی است(عابدیان،۱۳۸۵).

اسکلت خارجی (Exoskeleton)

میگو فاقد اسکلت داخلی است، ولی همانطور که بدن آن از ۱۹ بند (۵ بند سر، ۸ بند سینه، ۶بند شکم) تشکیل شده، اسکلت خارجی نیز به پیروی از آن به ۱۹ بخش تقسیم شده است .بین قطعات هیچ ذخیره ای از املاح کلسیم وجود ندارد بنابراین در این مناطق یک مفصل متحرک دیده می شود این مفصل اتصالی به میگو اجازه می دهد دم خود را به طرف بالا و پایین(نه به طرف جوانب) خم کند این کار باعث شنا می شود.

اتصال اسکلت خارجی و عضلات از طریق تعدادی صفحات و برآمدگی های نوک تیز انجام می گیرد. اسکلت خارجی از کوتیکول بدن سلول تشکیل شده و شامل چندین لایه به این شرح می باشد.

۱. لایهٔ خارجی یا اپی کوتیکول از جنس موم
۲. کوتیکولین از جنس لیپوپروتئین
۳. لایهٔ کیتینی اولیه از جنس کیتین و کوتیکولین و گاهی کربنات کلسیم
۴. لایهٔ کیتینی ثانویه از جنس کیتین و پروتئین
۵. اپیدرم که زیر اسکلت به صورت پوششی یک لایه ای قرار داشته و الیاف متعددی را به داخل دو لایهٔ ۳ و ۴ می فرستد.

کوتیکول نه تنها تمام سطح خارجی، بلکه قسمتی از دستگاههای گوارش، تنفس، مجاری مختلف و سطح غدد را نیز می پوشاند.

با توجه به اینکه وجود اسکلت خارجی از رشد میگو جلوگیری می کند لذا جانور برای رفع این محدودیت ناچار به پوست اندازی است پوسته خارجی در ابتدا نرم و کاملا شفاف است، اما پس از مدتی سخت و تیره می شود(مجیدی نسب،۱۳۷۷).

دستگاه گوارش

دستگاه گوارش از شش قسمت تشکیل شده است دهان، مری، معده، روده، مخرج و غدد گوارشی

الف-دهان: در سطح شکمی و بالای آرواره پایینی قرار دارد و عمل آن گرفتن مواد غذایی و خرد کردن آن است.

ب- مری: به صورت لوله ای کوتاه جهت انتقال مواد غذایی است.

ج- معده: بزرگ با دیواره نازک، در ناحیه سینه حیوان قرار دارد و دوقسمتی است:

۱-کاردیا: در قسمت جلو و نسبتا متسع

۲-پیلور: در قسمت عقب و کوچکتر است.

د- روده: از سه قسمت قدامی ، میانی، و خلفی تشکیل شده است.

۱-روده قدامی: حاوی دو اتاقک با دیواره چین خورده که واجد دوصفحه آهکی است و غذایی که به کمک زواید دهانی به این قسمت هدایت می شود به وسیله این صفحات خرد می شود:

۲-روده میانی: محل استقرار تعداد زیادی لوله و ضمایم گوارشی است که منفذ این ضمایم و لوله ها در دیواره روده باز می شود. هپاتوپانکراس در این ناحیه قرار گرفته است.

۳-رده خلفی: از روده میانی تا مخرج امتداد می یابد و کار آن شکل دادن به مدفوع است ولی از نظر گوارشی هنوز بخوبی شناخته نشده است.

ه-مخرج: محل خروج زواید غذایی بدن بوده ودر وسط زیر تلسون واقع شده است.

و-غده بزرگ گوارشی: دارای دو غده به نام غده کبدی و غده لوزالمعدی می باشد که در زیر معده واقع شده اند هر غده سه قسمتی است و از تعداد زیادی لوله های کوچک تشکیل شده که کار آنها هنوز بخوبی مشخص نشده است(عابدیان،۱۳۸۵).

فیزیولوژی

دستگاه گوارش

غذا به وسیله چنگالهای زوج دوم و سوم پاهای حرکتی گرفته شده و به طرف دهان برده می شود تکه های سفت و سخت از دهان بیرون می ریزند و قسمتهای نرم توسط آرواره پایینی خرد و از راه مری به طرف قسمت کارد یا هدایت می شود در اینجا دندانهایی قوی و آهکی وجود دارد که به وسیله عضلات متصل به دیواره ٔ معده حرکت می کنند ترتیب این دندانها به این صورت است که یک دندان در وسط و دودندان در اطراف است و حرکت این دندانها سبب ساییده شدن بیشتر و خردشدن غذا می شود ویک آسیاب معدی را ایجاد می کند. در

مدخل پیلور خارهای پرزمانند زیادی وجود دارد که فقط قطعات بسیار کوچک غذا از بین آنها عبور می کند. دیواره معده از پوشش سخت کیتینی ساخته شده که همراه با عضلات به هضم غذا کمک می کند. هپاتوپانکراس دارای تعداد زیادی لوله است و آنزیمی شبیه به آنزیمهای پانکراس ترشح می کند که در گوارش غذا نقش دارد. جذب غذا در قسمت ابتدایی روده انجام می گیرد و مواد هضم نشده به صورت مدفوع از مخرج خارج می شود لولهٔ گوارش به استثنای روده میانی از کیتین ظریف ونازکی پوشیده شده که با کوتیکول خارجی تا دهان ومخرج امتداد می یابد مجموعه این پوشش کیتینی با هر پوست اندازی جدا و مجدداً ساخته می شود در برخی فصول در دیواره های قسمت جلوی معده دو سنگ معده آهکی به وجود می آید و به نظر می رسد که کار آنها ذخیرهٔ املاح آهکی مانند کربنات کلسیم برای سخت کردن اسکلت خارجی پس از هر بار پوست اندازی است(عابدیان،۱۳۸۵).

دستگاه گردش خون

قلب میگو کوچک، عضلانی و تقریبا بدون شکل منظم، درحفره پریکارد قرار گرفته و به کمک ۶رباط که به دیواره سینوسها اتصال دارند به صورت آویزان نگهداری می شود خون همولنف به وسیله ۳ جفت دریچه از حفره پریکارد وارد قلب می شود و با انقباض قلب با فشار به درون سرخرگها رانده می شود در نتیجه خون به تمام قسمتهای بدن می رسد.

خون از سرخرگهای کوچکتر به داخل فضاهای باز یا حفره های میان اندامک های بدن جریان می یابد و پس از تبادلات لازم در حفره جناغی کف سینه جمع آوری و سپس وارد مجاری مخصوصی به نام مجاری آوران شده در نهایت به سوی آبششها روانه می گردد. در آبششها تبادلات گازی صورت پذیرفته سپس خون وارد مجاری وابران می شود و به طرف سینوسهای آبششی قلبی باز می گردد. فضاهای داخلی بدن یک حفره خونی یا Hemocoel را تشکیل می دهند گردش خون میگو از نوع باز ومخصوص بندپایان می باشد.

پلاسمای خون تقریبا بی رنگ و دارای رنگدانه تنفسی محلولی به نام هموسیانین است که اکسیژن را به طرف بافتها می برد هموسیانین آبی رنگ و حاوی مس بوده ، توسط سلول خاصی منتقل نمی شود بلکه در خون

محلول می باشد (هموسیانین در داخل بدن بی رنگ است و هنگامی که در مجاورت هوا با اکسیژن ترکیب گردد آبی می شود) (عابدیان،۱۳۸۵).

دستگاه تنفس

آبششها برجستگی های پرده مانند و ظریف دیواره بدن بوده حاوی مجاری خونی است که در طول هر دو طرف سینه درون محفظه ای قرار گرفته اند.

حفره آبششی به وسیله قسمت جانبی کاراپاس پوشیده شده ولی از ناحیهٔ شکم و دو انتهای جلو و عقب بازمی باشد آبششها در دو ردیف طولی قرار گرفته اند که این دوردیف آبشش مفصلی در هر طرف بدن واقع در حدود ۱۷ عدد است.

هر آبشش از یک محور مرکزی که در طول آن صفحات آبششی قرار گرفته اند تشکیل می شود این صفحات دارای بریدگیهای متعددی برانشیول هستند که آن را به صورت پرده های ظریف و مانند شاخه درخت نمایان می سازد از این رو به آن Dendro Bronchiata می گویند. این پره ها از طرف پایین به بالا آزاد می باشند کانال اصلی خون از میان محور مرکزی می گذرد و انشعابات خونی را به داخل صفحات می فرستند.

در میگو، آب به طور آزاد در حفرهٔ آبششی نفوذ می کند و جانور به وسیله اسکافوگناتیت (Scaphognathite) آرواره پایینی ، آبششها را شستشو می دهد . قابل ذکر این که ممکن است تنفس از طریق تراشه کاذب که در قسمت پلیوپود واقع شده است نیز انجام گیرد(عابدیان،۱۳۸۵).

دستگاه دفعی

شامل یک یا دو جفت غده سبز یا آنتنی بزرگ است که در سطح شکمی ناحیه سر و جلوی مری قرار گرفته ، کار دفع مواد زاید خون مایعات و کمک به فرآیند تنظیم اسمزی بدن را به عهده دارند هر غده سبز از ناحیه غده ای کیسه یا دیواره نازک دفعی و مجرا تشکیل شده است.

منفذ غده سبز در دو طرف قاعده آنتن ها قراردارد و در سطح شکمی به خارج راه می یابد. با توجه به اینکه در زمان پوست اندازی مقدار زیادی از مواد ازته و معدنی با پوسته جدا ودفع می شود، لذا پوست اندازی را می توان نوعی مکانیسم دفع تلقی نمود. در ضمن لوله مالپیگی در میگو وجود ندارد (عمادی،۱۳۸۴).

دستگاه عصبی

دستگاه عصبی میگو شبیه به حلقویان است، ولی نسبت به بدن بزرگتر و شامل یک طناب عصبی و مجموعه ای از گره های عصبی (Gangelion) می باشد.

عقده های فوق مری یا مغز که در ناحیه سر قرار دارند از ۱۳ بخش تشکیل شده و تعدادی عصب به چشمها و اولین و دومین جفت شاخک ها می فرستند مغز توسط یک جفت رابط عرضی به عقده های زیرمری متصل می شود. عقده زیر مری در میگوی بالغ خود شامل ۵ تا ۶ عقده است که به یکدیگر جوش خورده اند.این غدد در مراحل جنینی از هم مجزا بوده و از آن اعصابی به طرف ضمایم دهانی ، مری، غده های سبز و عضلات قدامی می رود. در طول طناب عصبی در بندهای هشتم تا نوزدهم بدن یک جفت عقده عصبی وجود دارند که اعصابی به ضمایم عضلات و سایر اندامها می فرستد(مجیدی نسب،۱۳۷۷).

سیستم عضلات

ماهیچه های میگو کاملا توسعه یافته است و کلیه حرکات ارادی جانور به کمک این دستگاه انجام می شود عضلات بدن میگو مرکب بوده، تماما درون اسکلت خارجی قرار دارد و به قسمتهای مختلف بدن متصل می شوند. عضلات به صورت زوجهای مخالف یکدیگرند و برحسب عملشان به دو دسته عضلات خم کننده و عضلات باز کننده تقسیم می شوند. بزرگترین عضلات، خم کننده ها هستند که موقع شنا کردن شکم را به جلو و زیر بدن خم می کنند(عابدیان،۱۳۸۵).

اندامهای حسی

قسمت اعظم بدن به ویژه چنگالهای قسمتهای دهانی، ناحیه زیرین کناره های شکم تلسون دارای حس لامسه هستند. در این نواحی پرزها برجستگی های پرمانند ظریفی از جنس کوتیکول هستند و در آنها الیافی وجود دارد که به اعصاب حسی متصل می شوند. حس های شیمیایی شامل چشایی، و بویایی در پرزهای واقع در اولین و دومین شاخکهای قطعات دهانی و قسمت انتهایی چنگال ها قرار دارند.

میگوها دارای گیرنده های حرارتی-شیمیایی تکامل یافته هستند این گیرنده های مویی شکل بسیار حساس بوده، نسبت به محرکهای شیمیایی حرارتی و PH واکنش نشان می دهند و همچنین برای تعیین موقعیت جنس مخالف به کار می روند. در کوتیکول، گیرنده های مکانیکی وجود دارد که نسبت به حرکت آب و لمس پاسخ می دهند در مجموع این اندامها به میگو قدرت شناخت محیط اطراف پیدا کردن پناهگاه، غذا، جنس مخالف و شناسایی محیط نامناسب و دشمنان را میدهند(عابدیان،۱۳۸۵).

حس تعادل

حس تعادل یا تعیین وضعیت نسبت به نیروی جاذبه زمین به علت وجود کیسه ای کوچک با استر کیتینی به نام استاتوسیت (Statocyte) است که در زیر پرزهای کوچک موجود در قسمت قاعده هر آنتنول مشاهده می شود. در استاتوسیتها یک برجستگی با تعداد زیادی پرز حسی ظریف و عمودی قرار دارد دانه های شن توسط موکوس به این پرزهای حسی چسبیده اند و مانند استاتولیت (Statolith)عمل می کنند کج یا وارونه شدن بدن میگو نسبت به جهت کشش نیروی جاذبه در وضع استاتولیتها تغییراتی به وجود می آورد که میگو را وادار به تصحیح وضعیت خود می کند. در هر پوست اندازی استاتولیت ها ودانه های شن از دست می روند ولی خیلی زود استاتولیتهای تازه از شنهای بستر آب ایجاد می شوند.

اگر میگویی که به تازگی پوست اندازی کرده در آب تصفیه شده قرار داده شود چون استاتولیتهای جدید به وجود نمی آید حس تعادل آن مختل می شود استاتولیتها در بسیاری از ده پایان از سیلیس و در برخی دیگر از سایر مواد معدنی سخت تشکیل شده است(مجیدی نسب،۱۳۷۷).

حس بینایی

عضو بینایی میگو شامل یک جفت چشم مرکب پایه دار است که هر یک از آنها دارای یک سطح خارجی مدورمی باشد. این سطح از کوتیکول شفافی به نام قرینه پوشیده شده و هر قرنیه از ۲۵۰۰ قطعه مربع کوچک به نام فاست تشکیل شده است به عبارت دیگر هر فاست انتهای خارجی یک واحد بینایی است. فاستها به وسیله رنگدانه ها از یکدیگر جدا شده اند و هر فاست منحصرا شعاع نوری را می گیرد که به طور قائم به آن تابیده باشد. پس هر فاست جزئی کوچک از جسمی را می بیند که میگو به آن می نگرد و فاستهای دیگر بخشهای دیگر جسم را می بینند لذا میگو دیدی موزائیکی خواهد داشت.

هر واحد بینایی تشکیل شده از:

الف- عدسی

ب- دو سلول قرینه زا

ج- یک سلول مخروطی شفاف

د- سلول رنگی دیستال

ه- شبکیه کوچکی و دراز مرکب از ۸ سلول که محور بینایی را احاطه کرده است.

و- سلولهای رنگی اطراف شبکیه

ز- سلولهای تپتوم(مجیدی نسب،۱۳۷۷).

غدد درون ریز(Endocrine Gland)

در پایهٔ چشم غده ای با ترشحات هورمونی وجود دارد که ترشحات آنها برای ادامهٔ حیات ضروری است، هرچند غدد مترشحه داخلی در میگوها به دقت مطالعه نشده اند ولی عده ای بر این باورند که غدد درون ریز در میگوها کاملا توسعه یافته و همانند مهره داران بسیاری از اعمال فیزیولوژیک تحت نظارت این غدد انجام می شود.

عمل هورمونها عبارتنداز:

- انتشار رنگدانه های اپیدرم در چشم

- تنظیم پوست اندازی

- رسوب املاح آهکی در اسکلت خارجی

۱-مجموعه اندام ایکس-غده سینوسی (X- organ- sinus Gland complex)

این مجموعه در پایه چشمی ده پایان قرار دارد و شامل توده ای از نرونهای عصبی ترشحی است و یکی از مهمترین غدد درون ریز از نظر پرورش دهندگان میگو به حساب می آید ترشحات این اندام متنوع بوده، احتمالا از بسیاری جهات معادل غده هیپوفیز مهره داران است.

هورمونهای شناخته شده این مجموعه عبارتنداز:

۱-هورمون تغییر دهنده رنگ چشم به وسیلهٔ تحریک رنگدانهٔ رتین

۲-دو نوع هورمون موثر در تغییر رنگ بدن که وظیفه آنها تغییر رنگ بدن از طریق تجمع یا پراکنده ساختن سلولهای رنگدانه ای است.

۳-هورمون تنظیم کننده قند خون (Hyperglycemic Hormone) که میزان قند خون را کنترل می کند.

۴-هورمون موثر در جلوگیری از پوست اندازی که وظیفه آن ممانعت از ساخت و ترشح هورمونهای پوست اندازی است.

۵-هورمون موثر درجلوگیری از رشد غدد جنسی(Gonad inhibitor Hormone)

دو هورمونی که پوست اندازی و بلوغ غدد تناسلی را کنترل می کنند با اهمیت بوده، فعالیت آنها تابع شرایط خاص فصل و غیره است لذا قطع پی چشمی در میگو یکی از روش های تحریک بلوغ جنسی به حساب می آید(مجیدی نسب،۱۳۷۷).

۲-اندام Y (Y- organ)

این اندام در بخش قدامی حفرهٔ آبششی قرار دارد و ترکیبات شیمیایی که از آن ترشح می شوند تحت عنوان هورمونهای پوست اندازی شناخته می گردند. این ترکیبات از گروه استروئیدها بوده، وظیفه اصلی آنها کنترل دفعات و فواصل بین پوست اندازی است به نظر می رسد که ترشحات این اندامها بر تخمک ها، میزان ذخیره غذایی آنها و همچنین سرعت رشد جنین موثر است.

در خرچنگ دراز آب شیرین، اندام Y در پایهٔ آرواره ٔ بالایی قرار گرفته و هورمون مترشحه از آن سبب تحریک پوست اندازی می شود.

۳-اندام پریکاردی(Pericardial organ)

این غده که درحفره قلبی لابسترها و خرچنگها مشاهده شده، احتمالا در بدن میگوها نیز وجود دارد وهورمونهایی ترشح می کند که عمل آنها هنوز بخوبی شناخته نشده است. این اندام از یک جفت شبکه عصبی ترشحی تشکیل شده که شدت ضربان قلب را کنترل می کند.

٤-اندام دهانی(Mandibular organ)

این اندام در بسیاری از سخت پوستان مشاهده شده و نقش آن در دگردیسی و تولید مثل به اثبات رسیده است.

٥-اندامهای رابط خلفی(Post Commissural organ)

این اندامها در مجاورت سیستم عصبی واقع شده اند و عمل آنها هنوز ناشناخته است هر چند عده ای معتقدند که هورمون مترشحه این اندامها در ارتباط با رنگدانه های میگو است(مجیدی نسب،۱۳۷۷).

دستگاه تولید مثل

در بیشتر گونه ها جنس نرو ماده ازیکدیگرجدا هستند ولی گونه هایی نظیر برخی از میگوهای پاندالوس معمولا ابتدا نر هستند و تعدادی از آنها بعداً به ماده تغییر جنسیت می دهند ولی در خانواده پنائیده، همه میگوها از ابتدا جنسیت مشخصی دارند. دستگاه تولید مثل ماده شامل تخمدانها مجرای تخمک بر منفذ و قسمت خارجی دستگاه تناسلی یا تلیکوم(Telicum) می باشد.

در جنس ماده تخمدانها به مجرای تخمک بر متصل شده اند که در قاعده سومین جفت پاهای حرکتی به خارج باز می شود تخمدانها در زمان تخم ریزی و بلوغ کامل به علت رشد زیاد تمام قسمت پشتی بدن را در بر می گیرند.هر تخمدان دارای سه قسمت قدامی، میانی و خلفی است.

لب میانی دارای شش برجستگی انگشت مانند است که از ششمین برجستگی مجرای تخمک بر به طرف منفذ تناسلی امتداد می یابد. براساس شکل تلیکوم میگوهای پنائیده را به دو گروه تلیکوم باز و تلیکوم بسته تقسیم می کنند وظیفه تلیکوم نگهداری اسپرماتوفورهایی است که حین عمل جفتگیری از میگوی نر به میگوی ماده منتقل شده است.

دستگاه تولید مثل نر شامل یک جفت بیضه لوله های اسپرم بر، آمپول انتهایی و قسمت خارجی دستگاه تناسلی یا پتاسما (Petasma) می باشد.

در جنس نر مجرای اسپرم بر از بیضه ها تا آمپولهای انتهایی کشیده شده ودر قطعه بازال و یا مجاور آن که به آخرین جفت پاهای حرکتی و اولین جفت پاهای شنا ختم می شود. پتاسما در حقیقت پایکهای داخلی اولین جفت پاهای شناست که پیش از بلوغ میگو از یکدیگر جدا هستند. پس از بلوغ این دو پایک به یکدیگر جوش خورده و تشکیل عضو واحدی به نام پتاسما را می دهند. بیضه ها در زیر حفره پریکارد و به رنگ سفید و حالت نرم به یکدیگر جوش خورده اند. کانال دفران به صورت پیچ در پیچ و باریک از بیضه ها تا آمپول انتهایی امتداد یافته است(عابدیان،۱۳۸۵).

بلوغ

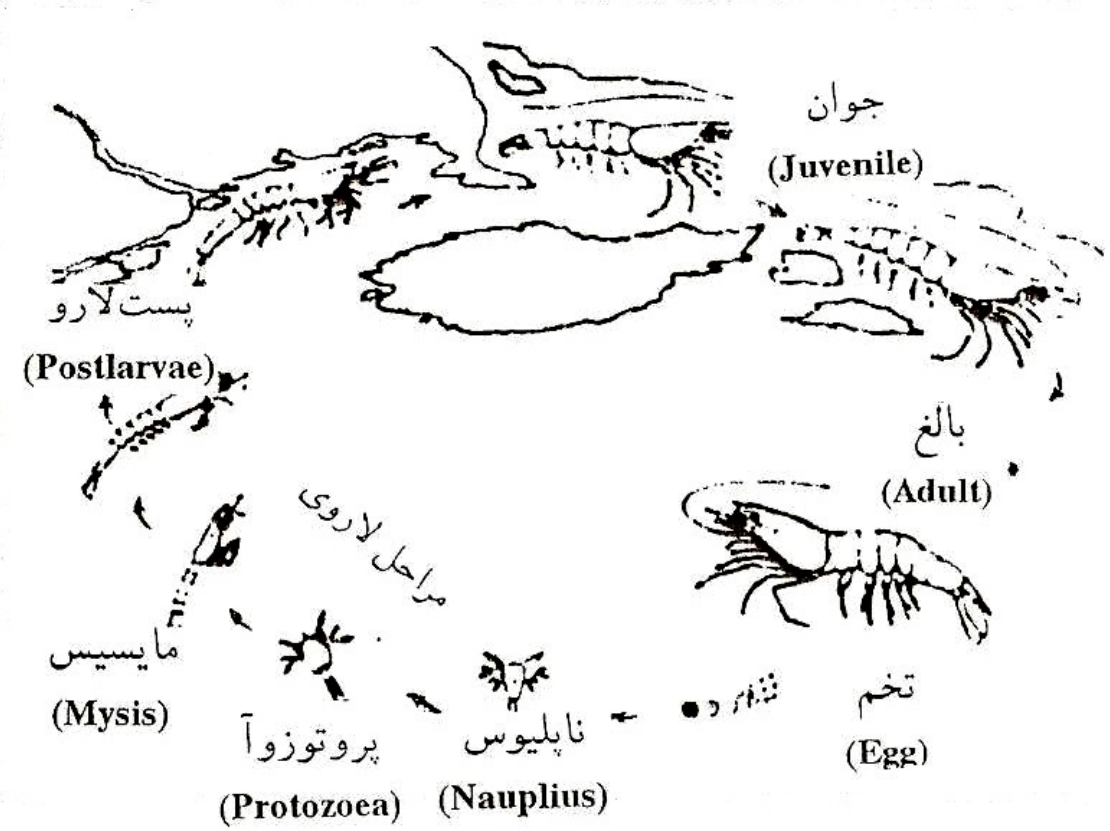
سن بلوغ در میان جنس و گونه های مختلف میگو متفاوت است . به علاوه ، شرایط زیست نیز بر آن تاثیر می گذارد. معمولا میگوهایی که ۶ ماه از عمر آنها می گذرد آمادگی تولید مثل را پیدا می کنند.

بلوغ میگوها به دو مرحله فیزیولوژیک و عملی تقسیم می شود:

الف-بلوغ فیزیولوژیک : رشد و توسعه گنادهاست که منجر به تولید تخمک و یا اسپرم می شود.

ب-بلوغ عملی: رشد و توسعه اندام تناسلی خارجی است که هم آغوشی را ممکن می سازد و مدت زمان این مرحله ۴ ماه می باشد.

از آنجا که بلوغ عملی زودتر از بلوغ فیزیولوژیک صورت می گیرد بنابراین نخستین هم آغوشی پیش از اولین تخم ریزی انجام می شود بلوغ جنسی در ماده را می توان با چشم غیر مسلح و مشاهده رنگ و اندازهٔ تخمها تشخیص داد.



تصویر ۱-۲. چرخه زندگی میگوی پنئوس ایندیکوس (FAO, 1985)

جفتگیری

عموما در شب انجام می گیرد. در گونه های با تلیکوم بسته مانند پنئوس سمی سولکاتوس، جفتگیری پس از پوست اندازی جنس ماده صورت گرفته و ماده قادر است اسپرماتوفور را در تلیکوم خود جای دهد و تا هنگام پوست اندازی مجدد از اسپرمهای زنده در زمانهای مختلف استفاده نماید اما در گونه های با تلیکوم باز نظیر متاپنئوس آفینیس Meta penaeus affinis جنس نر فقط با ماده با تخمدان رسیده و آماده برای تخم ریزی جفت گیری می کند زیرا اسپرماتوفور در مقایسه با گونه های با تلیکوم بسته به راحتی از تلیکوم آنها خارج می شود.

تخم ریزی و لقاح

اغلب میگوهای پنائیده در ماه های گرم سال هنگامی که دمای آب به بیش از ۲۰ درجه سانتی گراد می رسد در آب های دور از ساحل و در اعماق بیش از ۲۰ متر با درجه شوری بالای ۳۰ تا ۳۵ در هزار تخمریزی می کنند این میگوها بسترهای شنی را بیشتر ترجیح می دهند.

تخمریزی بین ساعات ۸ شب تا ۶ صبح و بیشتر بین ساعت ۲۲ تا ۲ با مداد صورت می گیرد. معمولا یک ماده ٔ آماده هنگامی که در بستر در حال استراحت یا حرکت است یک باره بی قرار شده و حرکات شنای دایره واری را آغاز می کند. در حین این عمل با باز و بسته کردن متناوب بدن تخم از سوراخ های جنسی که در قاعده سومین پای حرکتی واقع شده اند و اسپرم نیز از تلیکوم که در پنجمین پای حرکتی قرار دارد هم زمان خارج شده و لقای صورت می پذیرد. حرکات پاهای شنا موجب پراکنده شدن تخمک ها و اسپرم های غیرمتحرک در آب شده و درصد لقاح را افزایش می دهد. باروری مطلق در یک تخم ریزی نسبت به اندازه ماده متغیر می باشد.

در صورتی که جریان آب وجود نداشته باشد تخمها به تدریج ته نشین می شوند هنگامی که تخمها در تماس با آب دریا قرار می گیرند در قشر خارجی آنها واکنشی به وجود می آید که منجر به ایجاد یک لایه حفاظتی ژله مانند شده و از پلی اسپرمی تخمها جلوگیری می کند(مجیدی نسب،۱۳۷۷).

مرحله جنینی

پس از لقاح تقسیمات سلولی آغاز و به شکل گیری جنین منجر می شود در پایان آن تخم تفریخ شده و لارو اولیه یا ناپلیوس (Naupilius) از تخم خارج می شود فاصله زمانی آغاز این تقسیمات تا خروج لارو از تخم به شدت تحت تاثیر درجه حرارت و شوری محیط بوده، به علاوه در گونه های مختلف نیز متفاوت است به عنوان نمونه در گونه ٔ پنتوس سمی سولکاتوس زمان لازم جهت خروج ناپلیوس از تخم حدود ۱۸ ساعت است . شکل تخمها در ابتدا نامنظم است اما پس از چند دقیقه به واسطه ٔ جذب آب و ایجاد لایه حفاظتی تخمها حالت کروی به خود خواهند گرفت.

مراحل لاروی

دوران لاروی میگوهای پنائیده به سه بخش تقسیم می شود:

- ناپلیوس (Naupilius)
- پروتوزوآ (Protozoea)
- مایسیس (Mysis)

۱-مرحله ناپلیوس (Naupilius stage)

در این مرحله لاروادارای بدنی بیضی شکل و بدون بند است که طول آن در ابتدا بین ۰/۲۸ تا ۰/۳۳ میلی متر می باشد و چون ذخیرهٔ کافی زرده از مواد غذایی دارد ، تغذیه خارجی انجام نمی دهد اگر چه دو جفت از سه جفت زایدهٔ حرکتی به ناپلیوس اجازه شنا می دهد ولی در برابر جریانات و امواج تسلیم بوده، بنابراین زئو پلانکتون محسوب می گردد. آنها هم چنین به نور حساسند و جذب آن می شوند و در سطح آب ود یگر منابع نوری تجمع می کنند ودرجات شوری بالاتر از ۳۰ در هزار را ترجیح می دهند پس از ۶ بار پوست اندازی در مدتی کمتر از ۲ روز که هر بار پوست اندازی نیز با تغییر ریخت شناسی همراه است مرحله ناپلیوس خاتمه یافته و مرحله زوآ آغاز می شود.

۲-مرحله پروتوزوآ (Protozoeal stage)

این مرحله که به اختصار مرحله زوآ نامیده می شود حساسترین مرحله رشد لاروها است لاروها طولی بیش از ۱ میلی متر داشته ذخیره غذایی خود را از دست داده اند و قادرند از زی شناوران کوچکتر از ۲۰ میکرون تغذیه نمایند، چنانچه این لاروها غذای مناسبی پیدا نکنند. به سرعت از بین می روند هر چند حرکت این لاروها با آنتنک ها وسینه صورت می گیرد. ولی هم چنان زی شناور به شمار می آیند.

لاروهای مرحله زوآ طی سه زیر مرحله پیاپی که تقریبا بیش از ۴ روز به طول می انجامد تغییر شکل می یابند. نخستین زیر مرحله با ظهور چشمهای مرکب همراه است دومین زیر مرحله با ظاهر شدن روستروم مشخص می شود در پایان یک جفت پای اوروپود پدیدار می شود و سپس وارد مرحله بعدی یعنی مایسین می گردد.

۳- مرحله مایسیس (Mysis stage)

در اغاز این مرحله ، لاروها حدود ۴ میلی متر طول دارندو با حرکات سینه ای و پاهای حرکتی به طرف جلو حرکت می کنند. آنها اکنون تمایل بیشتری به غذاهای جانوری پیدا کرده اند و انواع زی شناوران جانوران نظیر روتیفرها، لارو آرتمیا و سخت پوستان کوچک را مورد تغذیه قرار می دهند.

بهترین مشخصه ٔورود به مرحله مایسیس ، ظهور وضعیت عمودی در هنگام شناست. لاروها طی ۴ بار پوست اندازی، در مدت ۴ روز این مرحله را پشت سر گذاشته، درآخرین زیر مرحله مایسیس ، پاهای شنا یا شکمی، بند بند و کاملا رشد یافته اند ، اما در عمل هنوز کامل نیشتند. آنها بعضی مواقع در بستر ساکن می شوند سپس وارد مرحله بعدی یعنی پست لاروی می شوند(عابدیان،۱۳۸۵).

٤- مرحله پست لاروی (Post larval stage)

پست لاروها، در مراحل ابتدایی تا حدود زیادی به بالغین شباهت دارند. بدن آنها شفاف بوده و رشته ای طویل به رنگ قهوه ای تیره از نوک ساقه اصلی شاخک حسی تا انتهای تلسون کشیده شده است. اندازه ٔ ششمین حلقه شکمی، بزرگتر از طول کاراپاس می یاشد. در دوره های پایینی این مرحله ، طول بدن و کاراپاس افزایش می یابد، از شفافیت بدن کاسته شده ، رنگ آنها تیره تر می شود. آنها از غذاهای جانوری نظیر پاروپایان ، روتیفرها، خرچنگهای کوچک و غیره تغذیه می کنند و چنانچه غذای کافی در دسترس نباشد، به هم جنس خواری یا کانی بالیسم تمایل می یابند. در پایان این این مرحله که با ۴ بار پوست اندازی همراه است ، میگوی جوان نابالغ(Juvenile) ظاهر می شود. این میگوها مشخصاً کف زی شده و با استفاده از پاهای سینه ای برسطح بستر می خزند و توسط پاهای شنا، عمل شنا را انجام می دهند. میگوهای آب شور ، قادرند نوسانات شدید شوری از یک تا ۶۰ در هزار و دمای ۱۰ تا ۳۹ درجه سانتی گراد را تحمل می کنند. این طاقت و تحمل به منظور بقایای آنان در مهاجرت به خورها ، مانگروها یا درختان حرا و مصب ها که تغییرات وسیع فیزیکوشیمیایی را درپی داردلارم است. مهاجرت پست لاروها از بخشهای دور از ساحل به این مناطق ، ناشی از علل مختلف از جزیره غزیره طبیعی، جریان جزر و مد ، وزش باد و نیز حرکات شنای آنهاست(عابدیان،۱۳۸۵).

بلوغ اولیه

در این مرحله ، میگو شباهت کامل به بالغین داشته ، ابعاد بدن تقریبا ثابت باقی می ماند و اندامهای تناسلی پدیدار می گردد. در پایان این مرحله که حدود ۴ ماه به طول می انجامد، میگومناطق مصبی و خورها را رها کرده و به

آبهای ساحلی و دور از ساحل مهاجرت می کند. این مهاجرت برای تکامل و رسیدگی جنسی ضروری است. زمانی که طول کاراپاس به ۱۱ میلی متر برسد، جنسیت مشخص می گردد(مجیدی نسب، ۱۳۷۷).

۵-۱- روشهای کلاسیک و مدرن و دستکاریهای ژنتیکی در سطوح کروموزومی و به گزینی در میگو

روشهای کلاسیک و مدرن و دستکاریهای ژنتیکی در سطوح کروموزومی

دستکاری کروموزومی موجودات دریایی نقش مهمی در آبزی پروری بازی می نماید. ویژگی های تولید مثلی میگو کنترل باروری و هم زمانی توسعهٔ تخم را درمیگو مشکل می سازد بنابراین روند تحقیقات دستکاری میگو به آرامی پیش می رود.

پلی پلوییدی (Polyploidy)

غالب ابزیان در شرایط طبیعی دارای ۲ سری کروموزوم (۲n) بوده و بدین لحاظ دیپلوییدمحسوب می گردند. اما اگر به عللی در تعداد سری کروموزومها تغییر ایجاد گشته مثلاn کروموزوم اضافه گردد، موجود حاصل (۳n)کروموزومی یا تریپلوییدو اگر n ۲ کروموزوم اضافه گردد، موجود حاصل (۴n) کروموزومی یا تتراپلوییدخواهد بود.ایجاد تتراپلوییدی سخت و تلفات آن بسیار زیاد است و در برخی گونه ها همچون تیلاپیا عملی نیست. امروزه بحث (۳n)کروموزومی یا تریپلوییدی درآبزیان مطرح است که به واسطه اختلال درتقسیم میوز به هنگام گامتوژنز موجود عقیم تلقی می گردد و در نتیجه پدیده بلوغ که باعث تغییراتی در رشد ، ضریب تبدیل غذایی ، پایین آمدن کیفیت گوشت به دلیل ترشح برخی هورمونهای جنسی ، حساسیت نسبت به بیماری ها ، مرگ و میر بعد از تخم ریزی که در ماهیانی همچون ازاد ماهیان مطرح است ، اتفاق نمی افتد. مطالعات نشان داده که ماهیان تترا پلویید ۶ ماهه ۲۰ درصد رشد بالاتری را نسبت به گروه شاهد دارند. پلوییدی درمیگوهای پنئیده با استفاده از شوکهای شیمیایی و دمایی با موفقیت انجام شده است ، میگوی*p. Indicus* تتراپلویید و تری پلویید به وسیله شوک حرارتی به مدت ۱-۷ دقیقه ، ۵-۴۶ دقیقه بعد از تخم ریزی تولید می شوند (AQUACOP و همکاران،۱۹۹۳). شوک گرمایی به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه با سیتوکالازین B به مدت ۵۰-۵۵ دقیقه به ترتیب ۳۶-۶۰ درصد و ۲۱-۶۶ درصد تترا پلوییدی در *P. Chinensis* ایجاد می کند (Xiang و همکاران،۱۹۹۲). مطالعات

اندکی درزمینه پلی پلوییدی میگوها انجام گرفته است. که ازان جمله می توان به مطالعه xiang و همکاران (۲۰۰۱) در مطالعه میگوی چینی ،Sellar و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه میگوی کروما در زمینه تریپلوییدی و مطالعه Sellar و همکاران (۲۰۰۶) در زمینه تتراپلوییدی اشاره کرد.

در تولید ابزیان تریپلوییدی از دو روش القایی و غیرالقایی استفاده می شود.

تریپلوییدی القایی (مستقیم)

مبنای این روش در ابزیان، براساس احتباس دومین گویچه قطبی پس از لقاح (early shock) و توسط کاربرد شوکهای محیطی (شوک دمایی، فشارو شیمیایی) می باشد.

۱n اسپرم +۱n گویچه قطبی + ۱n تخمک ⟶ ۳n

اما sellar و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه تولید میگوهای تری پلویید از طریق احتباس اولین گویچه قطبی در میوز ۱ (PB1) و همچنین احتباس اولین و دومین گویچه قطبی (PB2) با استفاده از ماده شیمیایی۶- دی متیل امین پورین درزمانهای متفاوت برای مدت زمان های مختلف دریافتند که هر دو روش (PB1) و(PB2) در تولید میگوی kumura موفقیت آمیز بوده است. ترپلوییدهای حاصله از(PB1) رشد بالاتری از ترپلوییدهای حاصله از(PB2) دارند که این احتمالا به دلیل افزایش هتروزایگوسیتی می باشد و این در گونه های آبزی دیگرهم چون اویستر امریکایی (stanley *et al*., 1984) و ماسل آبی (Beaumonet and kelly, 1989). نیزمشاهده شده است.

تریپلوییدی غیرالقایی (غیرمستقیم)

در این روش ابتدا به تولید مولدین تتراپلویید پرداخته و سپس با آمیزش ماهیان تتراپلویید و دیپلویید ، افراد تری پلویید ایجاد می نمایند. آمیزش ماهیان تتراپلویید ماده و دیپلویید نر افراد تری پلویید ایجاد می نمایند.

این روش در بسیاری از گونه های دریایی همچون *crassostra gigas*(Gue and Allen,1994;Gue *et al* ., 1996; Wang *et al*., 2002) و هیبرید اویستر (*C. gigas***C. ariakensis*) (Huayong and Allen, 2002) ، قزل الای رنگین کمان (*Crassius auratus* red var * *Cyprinus carpio*L.) (Liu et al., 2001) ، هیبرید کپور (Chourrout *et al*., 1986) موفقیت آمیز بوده است.

Li و همکاران (۲۰۰۳) در مطالعه توسعه گناد و نسبت جنسی در میگوی چینی اعلام کردند که تریپلوییدی می تواند روی نسبت جنسی و افزایش میزان ماده ها دراین گونه تاثیر بگذارد .

تولید مولدین تتراپلویید

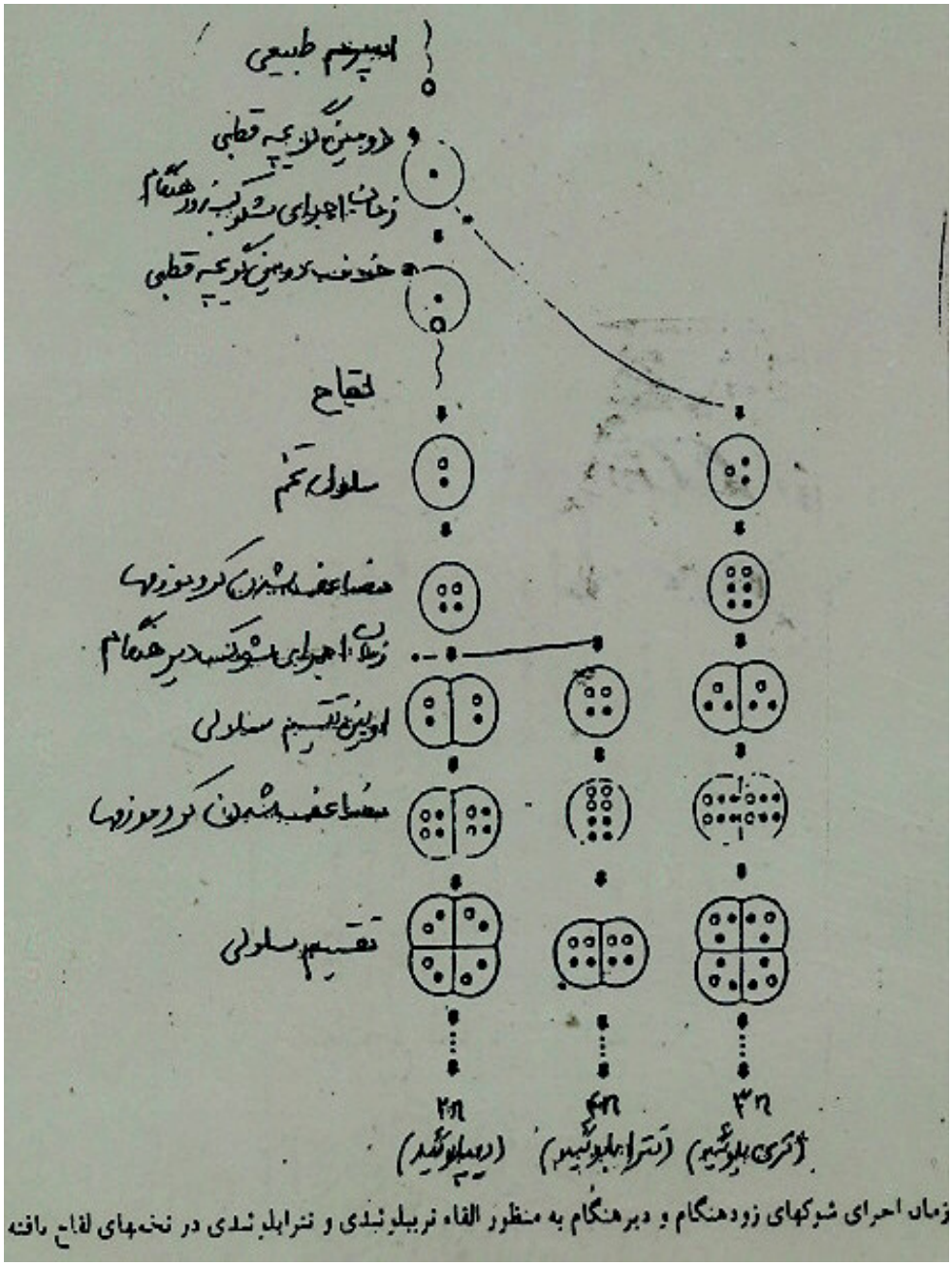
در ایجاد موجودات تتراپلویید بعد از لقاح اسپرم و تخمک اجازه خروج گویچه قطبی داده نمی شود. منتها قبل ازاولین تقسیم جنینی بعد از اینکه ۲n به ۴n تبدیل شد شوک وارد شده (شوک تاخیری) و مانع از ایجاد دیواره جنینی می گردد.

$$\begin{array}{l} n\downarrow \quad \downarrow n \\ ۲n \rightarrow ۴n \rightarrow ۸n \rightarrow ۴n \\ \qquad\qquad\quad \rightarrow ۴n \end{array}$$

sellar و همکاران (۲۰۰۶) درمطالعه تاثیر شوک سرمایی، گرمایی و ماده شیمیایی۶- دی متیل امین پورین درزمانهای متفاوت برای مدت زمانهای مختلف در القا تتراپلوییدی در میگوی kuruma ، دریافتند که تنها شوک گرمایی در دمای ۳۶ درجه ، ۲۳ دقیقه قبل از تخم ریزی برای مدت ۵-۱۰ دقیقه موثرترین روش در تولید تتراپلوییدی بوده و ماده شیمیایی شیمیایی۶- دی متیل امین پورین اصلا موجب القا تتراپلوییدی در میگوی kuruma نشد.

پس از القا تری پلوییدی لازم است تا نتیجه کار جهت تعیین درصد موفقیت آن تعیین گردد زیرا اصولا پلی پلوییدی بر روی شکل ظاهری آبزیان تاثیرخاصی نداشته (حتی قبل از بلوغ) و نمی توان ازظاهر نسبت به تعیین درصد پلوییدی آنها قضاوت نمود. مطالعه xiang و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد تریپلوییدی در میگوی چینی موجب رشد بیشتر بعد ازبلوغ می گردد. ولی با انالیزخون قبل از بلوغ می توان میگوی چینی دیپلویید را از تریپلویید تشخیص داد که گلبولهای خونی درتریپلویید از نظر تعداد کمتروازنظر حجم بزرگترازدیپلویید ها هستند. تعیین و تشخیص ماهیان پلی پلوییدی مورد استفاده قرار می گیرد که اجرای برخی از انها ساده و کم هزینه بوده و برخی نیازمند وسایل و تجهیزات ویژه ای می باشند.

تهیه گسترش های کروموزومی و شمارش تعداد کروموزومها ،اندازه گیری و آنالیز حجم هسته و گلبولهای قرمز، تعیین مقادیر DNA سلولی توسط دستگاههای پیشرفته میکروفلوئومتری و میکرودنسیتومتری، بافت شناسی، بررسی تعداد هستکها والکتروفورز پروتیین های خون می تواند در تشخیص موجودات تریپلوییید از دیپلوییید کمک نماید.



زمان اجرای شوکهای زودهنگام و دیرهنگام به منظور القاء تریپلوئیدی و تتراپلوئیدی در تخمهای لقاح یافته

روشهای کنترل جنسیت

سلول نخم دارای دو دسته کروموزوم است که یک دسته ازکروموزومهای تخمک و دستهٔ دیگر از کروموزومهای اسپرم گرفته شده است. اگر کروموزومهای جنسی تخم xx باشد جنسیت ماده و اگر xy باشد نر خواهد شد. بجزموارد استثنا درماهیها تقریبا همین سیستم وجود دارد. با وحود اینکه تعیین جنسیت ژنتیکی بعد ازلقاح اتفاق می افتد ولی اختلافات جنسی تا زمان تفریخ شدن ظاهر نمی شود و به همین دلیل توان زیادی برای دست کاریهای مصنوعی در ماهی وجود دارد که در این قسمت معایب و مزایای روشهای تغییر جنسیت و عقیم کردن مورد بررسی قرار می گیرد.

تغییر جنسیت Sex reversal

تعیین جنسیت تنها در تعداد کمی از گونه های سخت پوستان مطالعه شده است که هیچ یک از آنها در مورد ده پایان نبوده است (legarand *et al*., 1987) . مطالعات تاثیرشدید فاکتورهای محیطی (دما، ذخیره غذایی و محیط) بر تعیین جسیت در برخی از گروه های سخت پوستان به وسیله korpleinon (۱۹۹۰) مورد بررسی قرار گرفت اما هیچ گزارشی مبنی بر تعیین جنسیت محیطی و کروموزوم جنسی در پنئیده گزارش نگردید. تغییر جنسیت ازمایشی برای تعیین مکانیزم تعیین جنسیت تعدادی از گونه های سخت پوستان استفاده شد (legarand *et al*., 1987) . کاشت غدد اندروژنیک در میگو های ماده ماکروبرکیوم برای تولید میگوهای نئو میل با توانایی تولید مثل انجام گرفت(Sagi and Cohen, 1990) حضور فرزندان نر حاصل از آمیزش نئومیل ها با ماده های معمولی نشان داد که جنسیت ماده ها هتروگامتیک می باشد(WZ). همه ماهیان به لحاظ دارا بودن گناد به دو سیستم تک گنادی (Gonadosist) و دو گنادی (Hermapherodit) تقسیم می شوند. در ماهیان تک گنادی اندام جنسی از عضوی به نام (Ovotestis) که پتانسیل تبدیل به اوول و تستیس را دارد، منشأ می گیرد، این جسم اولیه اگر هورمونهای جنسی نرینه را در اختیار بگیرد تبدیل به بیضه و اگر هورمونهای جنسی مادینه را در اختیار بگیرد تبدیل به تخمدان می شود. زمانی که ماهی به مرحلهٔ تمایز جنسی می رسد یک سری هورمون هایی از مغز روی ovotestis می ریزد که باعث تحریک این اندام و و آزادسازی هورمون هایی می شود که باعث تبدیل به Ovol یا

Testis می گردد. در هرمافرودیتها تمایز هم زمان پیش می رود و به جایی می رسد که موجود هم می تواند بیضه و هم می تواند تخمدان داشته باشد .

Protogynous : در اولین بلوغ موجود تبدیل به ماده می شود ، بیضه ندارد و در بلوغ های بعدی تبدیل به نر می گردد. می تواند تکرر داشته باشد ، مثلاً اویستر به تناوب نر و ماده می گردد.

Protoandrous : در اولین بلوغ موجود تبدیل به نر می شود، در ماهیان دریایی به کرّات دیده می شود. به عنوان یکی از مشکلات ماهیان دریایی به شمار می آید.

در تغییر جنسیت به جز هورمون ،عوامل دیگری همچون گونه، سن ماهی ، مدت زمان تجویز هورمون و درجه حرارت نقش دارند. مثلاً در کپور ماهیان در ۲۰ درجه جنسیت بینابین ایجاد شده ولی در ۲۵ درجه تغییر جنسیت ایجاد می شود.

اهدافی که در Sex reversal مد نظر است:

نر سازی Femenization

ماده سازی Masculization

در ماده سازی هورمونهای استرول، استریول، 17-β stradiol ، دخالت دارند.

در نر سازی هورمونهای ۱۱- کتوتستسترون، ۱۷ –α- متیل تستسترون ..... دخالت دارند.

روشهای معرفی هورمون :

روش plate oral : مناسب برای ماهیانی که غذای دستی را قبول نمی کنند.

روش غوطه ورسازی : برای ماهیانی که تمایز سریع دارند. مثل سوف

روش تزریق و کاشت هورمون (استفاده از میکروکپسول ها). مثل آمور

روشهای تشخیص:

تهیه مقاطع بافتی ورنگ آمیزی که بافت گناد نر حالت نقطه ای و تخمدان حالت فولیکولی دیده می شود . در حالت overdose آندروژن ها حالت بافت چربی و در under dose آنها جنسیت بینابینی را مشاهده می کنیم.

ماده زایی gynogenesis

ژینوژنزیز یعنی تکامل جنین از تخمک بدون دخالت و مشارکت مواد وراثتی اسپرم. این روش در واقع یک نوع تکثیر پارتنوژنز (Parthenogenesis) محسوب می‌شود و فعّال کردن روند تکاملی سلول تخم از طریق اسپرمی که از لحاظ ژنتیکی غیرفعال شده است، صورت می گیرد. ژینوژنز در مهره‌داران پست بصورت یک پدیده طبیعی اتفاق می‌افتد و در آن فرزندان دو دسته از کروموزومهای مادری را دریافت می کنند (Dawley, 1989) . در پدیده ژینوژنز، اسپرم فقط نقش فعال‌کننده تکامل تخم را به عهده دارد و اگر در شرایط طبیعی هیچ اقدامی یا واکنشی برای حبس دومین گویچه قطبی صورت نگیرد، سلول تخم به صورت هاپلوئید (N کروموزومی) بوده و قبل ازهچ شدن تلف می گردد (Purdom, 1983). گرچه پذیرش این امر در زیست‌شناسی موجودات بسیار دشوار است ولی اولین بار Hertwig در سال ۱۹۱۱ القاء ژینوژنز مصنوعی در قورباغه را مورد بررسی قرار داد و بعدها مشخص شد که ژینوژنز حتی به صورت طبیعی (بدون دخالت و دستکاری بشر) در بعضی از موجودات اتفاق می‌افتد. ژینوژنز به طور طبیعی در گونه *Poecilia formosa* توسط Hubbs and Hubbs (1932) و در ماهی حوض (*Carassius auaratus gibelio*) توسط Cherfas در سال ۱۹۶۶ گزارش شده است. نوعی دیگری از ژینوژنز که در طبیعت اتفاق می‌افتد ورود اسپرم سایر گونه‌ها به تخمک گونه دیگر می‌باشد که برای تفکیک این نوع ژینوژنز با حالت ژینوژنز طبیعی آن را (allogynogenesis) می‌نامند. در این حالت معمولاً از اسپرم گونه‌هایی استفاده می‌شود که از لحاظ ژنتیکی فاصله زیادی با گونه مربوطه داشته باشد و در این خصوص تولید ماهی ژینوژنز در flat fish در انگلیس گزارش شده است (Purdom, 1983).

ژینوژنزیز مصنوعی

ژینوژنز مصنوعی را می‌توان از تلاقی سلول تخم دیپلوئید با اسپرمی که از لحاظ ژنتیکی غیرفعال شده است تولید کرد. برای غیرفعال کردن اسپرم از روشهای مختلف، اشعه ایکس، گاما و یا اشعه ماوراء بنفش یا UV استفاده

می‌گردد. اشعه‌های ایکس و گاما بعلت انرژی بسیار زیاد و بالا بودن قدرت نفوذپذیری آن سبب تخریب کامل ژنوم اسپرم و حتی در حد شکستن اسپرم مؤثراست (Chourrout, 1984). ولی میزان نفوذ اشعه UV به مراتب کمتر از اشعه‌های X و گاما است و بعضاً منجر به نابودی صد درصد اسپرم نمی‌شود. به علت نتایج بسیار متفاوت در بازماندگی ژینوژنز که در مطالعات اولیه مشاهده گردید، محققین مبادرت به استاندارد کردن روشهای اشعه دهی نمودند. لذا ضروری است یک سری آزمایش و خطا در تاباندن اشعه مورد نظر برروی اسپرم گونه خاص صورت پذیرد، تا مدت زمان و فاصله منبع اشعه تا نمونه اسپرم به دقت محاسبه، تنظیم و استاندارد گردد. اشعه UV سبب تخریب و شکسته شدن پیوند هیدروژنی بین بازهای آلی در زنجیره DNA اسپرم می‌گردد و موجب تشکیل پیوند دایمر بین بازهای آلی می‌شود.

سلول تخم دیپلوئید را می‌توان به سه طریق ذیل در طی تقسیم میوز یا میتوز ایجاد کرد:

۱. جلوگیری در تقسیم میوز اول (endomeiosis)
۲. جلوگیری در تقسیم میوز دوم (احتباس دومین گویچه قطبی)
۳. جلوگیری در تقسیم میتوز (endomitosis)

جلوگیری از تقسیم میوز اول

تاکنون گزارشی مبنی بر القاء (endomeiosis) بصورت مصنوعی ارائه نشده ولی یک روش بسیار رایج در ژینوژنزیز طبیعی است که منجر به تولید گونه‌های تریپلوئید می‌شود. بهترین مثال در این خصوص مطالعات انجام شده در گونه کپور کاراس (*Carassius auratus gibelio*) است . در این کپور تکثیر کروموزومها قبل از تقسیم میوز اتفاق می‌افتد و در آن "سیناپس" و "کراسینگ‌آور" شکل نمی‌گیرد و ظاهراً تمام پروسه تقسیم میوز اول در این گونه حذف می‌شود. تخمک‌های هگزاپلوئید، یک مرحله تقسیم میوزی پس از عمل لقاح را طی می‌کند و در آن سه کروماتید خواهری همولوگ نیم تتراد و جنین تری پلوئید تولید می‌گردد (Cherfas 1994).

جلوگیری از تقسیم میوز دوم

جلوگیری از تقسیم میوز دوم رایج‌ترین روش برای تولید بچه ماهیان ژینوژنز می‌باشد و علت اصلی آن تکنیک ساده و سهولت در انجام آن می‌باشد (Nagy *et. al*. 1978, Chourrout *et. al.*, 1984).

اساس کار با این روش تخریب و شکستن تقسیم سلولی در تقسیم میوزی با استفاده از شوکهای فیزیکی که به تخم وارد می‌شود، است. شوک‌های فیزیکی می‌تواند یا شوک‌های حرارتی (سرما یا گرما) و یا شوک فشار باشد که در هر دو حالت میکروتوبولی‌هایی که دوکهای تقسیم سلولی میوزی را تشکیل می‌دهند شکسته می‌شود. در این روش با استفاده از شوک‌های فیزیکی، اولین گویچه قطبی بلافاصله پس از عمل لقاح در درون سلول تخم احتباس می‌گردد و بخشی از بچه ماهیان تولید شده هتروزیگوت هستند. این امر بدلیل کراسینگ‌آوری که در مراحل تقسیم میوزی اتفاق می‌افتد می‌باشد، به عبارت دیگر ۱۰۰٪ بچه ماهیان تولید شده خالص ویا (Homozygous) نمی‌باشد.

جلوگیری از اولین تقسیم میتوزی

دراین سیستم قبل از تقسیم میتوز اول، یک دسته کروموزوم هاپلوئید در تخم اوول شده و یا لقاح یافته، تکثیر می‌یابد (دوبرابر می‌شود) در این مرحله هر کروموزوم دارای ۲ کروماتید مشابه خواهری هستند که در اولین تقسیم سلولی از همدیگر جدا می‌شوند. درطی پروسه endomitosis کروماتیدهای خواهری ازهمدیگر جدا می‌شوند ولی اولین تقسیم سلولی صورت نمی‌گیرد و جنین 2n کروموزومی می‌شود، ژنوتیپ فرزندان کاملاً شبیه ژنوتیپ مادری است و فرزندان از لحاظ ژنتیکی بسیار مشابه و یا homozygous هستند.

همانند استاندارکردن اشعه‌دهی به اسپرم، برای شوک‌های فیزیکی (گرما، سرما و فشار) ضروری است یک سری آزمایش برای تنظیم بهترین زمان شوک‌دهی (چند دقیقه پس از لقاح)، مدت زمان شوک‌دهی (طول دوره زمانی یا مدت شوک‌دهی) و شدت میزان شوک برای گونه مورد نظر باید صورت پذیرد تا نتایج مطلوب از آزمایش مربوطه بدست آید.

در گزارش‌های مختلف تحقیقاتی تاکنون کاربردهای متعددی برای ماهیان ژینوژنز تولید شده اعلام گردیده است. هدف اصلی تولید ماهی ژینوژنز در آبزی‌پروری، تولید جمعیت‌های تک جنس ماده می‌باشد در بعضی از

گونه‌ها رسیدن ماهی به بلوغ جنسی در سیستم پرورشی پلی‌کالچر سبب تکثیر طبیعی ماهی می‌گردد. به عنوان مثال بعضی از گونه‌های ماهی تیلاپیا درسنین پائین‌تر از یکسال به بلوغ جنسی می‌رسند و در استخرهای پرورشی در اثر زادآوری سریع، بچه ماهیان زیادی تولید می‌شود که از یک طرف در اثر نظم بیولوژیکی استخر از حالت تعادل خارج می‌گردد و از طرف دیگر پرورش‌دهنده به جای تولید ماهیان با وزن بازاری، با تعداد بیش از حد بچه ماهی در استخر مواجه خواهد شد. ثانیاً وقتی جنس ماده دیرتر به سن بلوغ برسد با تولید ماهی تمام ماده، پرورش دهنده می‌تواند ماهیان بزرگتر از وزن معمولی تولید و به بازار عرضه دارد. ثالثاً در بعضی از گونه‌ها مثل ماهیان خاویاری جنس ماده به علت تولید خاویار و ارزش اقتصادی از اهمیت بالاتری نسبت به جنس نر برخوردار است و اکثر پرورش‌دهندگان ماهیان خاویاری تمایل دارند ماهی جنس ماده را پرورش دهند.

از اهداف اصلی تولید ماهی ژینوژنز تولید inbred line است. براساس روش کلاسیک تلاقی (full-sib) حداقل ۱۵-۱۰ نسل نیاز است تا لاین خالص تولیدگردد و این کار برای گونه‌های مثل کپور که حداقل ۱/۵ سال برای رسیدن به سن بلوغ نیاز دارند بین ۱۵-۱۰ سال به طول می‌انجامد ولی با استفاده از تکنیک ژینوژنز و تغییر جنسیت (Sex reversal) حداکثر پس از ۵-۴ نسل یعنی ۷/۵-۶ سال می‌توان لاین خالص کپور معمولی را تولید نمود. این زمان برای گونه‌هایی که زمان رسیدگی جنسی و بلوغ آن کوتاه تر است کوتاه و برای گونه‌هایی مثل تاسماهیان که طولانی‌تر است بیشتر خواهد بود. از دیگر کاربرد ژینوژنزیز بررسی ژنهای جهش یافته و اثر ژنهای مغلوب در حالت هموزیگوت است.

با استفاده از تکنیک‌های ژینوژنزیز و آندروژنزیز لاین‌های کاملاً خالص در انواع ماهیان از قبیل ماهی زبرا، ayu ، کپور معمولی، تیلاپیا رودخانه نیل و قزل‌آلای رنگین‌کمان تولید گردید (Komen *et. al*., 1991;) (Sarder *et. al*., 1999). این لاین‌ها در تمام ژنوم خود دارای ژنوتیپ مشابه و یکسانی دارند. مطالعات متعدد نشان داد که ماهیان در لاین‌های مختلف، بسیار متغیر و متفاوت هستند به علاوه بنظر می‌رسد ماهیانی که بیش از حد هموزیگوت هستند توانایی خود را در پاسخ به عوامل محیطی از دست می‌دهند و حتی اختلافات بسیار جزئی محیطی اثرات متفاوتی بر افراد مختلف می‌گذارند (Komen *et. al*., 1991) .

نتایج نشان داده است که همانقدر که تنوع ژنتیکی در لاین‌های ایجاد شده کاهش یافته ولی القاء تنوع از طریق عوامل محیطی حتی سریعترازجمعیت‌های هتروزیگوت افزایش می‌یابد (Komen *et. al*., 1991) .

میزان خویشاوندی (inbreeding) از طریق ژینوژنزیز دقیقاً معادل یا مساوی با یک نسل از تلاقی full-sib می‌باشد. ژینوژنز میتوزی تماماً به صورت هموزیگوت هستند اما اکثر بچه ماهیان بعلت فراوانی بالای ژنوتیپ‌های کشنده که ۱۰۰٪ در افراد هموزیگوت یافت می‌شود در طی تکامل جنینی تلف می‌شوند.

نر زایی Androgenesis

هدف از این تکنیک ایجا د نتاجی است که مواد وراثتی را فقط از والد نر به ارث برده باشند. که برای ایجاد این گونه ماهیان باید فعالیت ژنتیکی تخمک را از بین برد و از آن در پروسه لقاح استفاده کرد. این تکنیک فقط برای تولید مولد line در تعداد کم مناسب است. تلفات دراین روش بالاست. چون تخمک در این مرحله فاقد مواد مواد وارثتی گویچه دوم قطبی است، پس شوک زود هنگام (early shock) معنی ندارد.

تولید ماهیان تمام نر (Androgenesis) بسیار دشوارتر از ژینوژنزیز است چون ماهی دیپلوئید در حالت آندروژنزیز فقط باید در اولین تقسیم سلولی تولید گردد که زمان بسیار دشواری برای دستکاری‌های جنینی است (Purdom, 1993). بچه ماهیان تولیدی از طریق آندروژنز همویگوت هستند و درصد بسیار بالایی از آنها به علت ژنوتیپ‌های خالص کشنده در طی مراحل تکاملی جنینی تلف می‌شوند (Purdom, 1993).

روش های تشخیص

استفاده از مولد زال، در ژاینوژنز مولد ماده را زال و نر را غیر زال انتخاب می کنیم و در اندروژنز نر را زال و ماده را غیر زال انتخاب می کنیم .

الگوی فلس

کاریوتیپ از روی کروموزومهای جنسی(سیتوژنتیک)

مطالعات مولکولی استفاده از الکتروفورز و PCR

با استفاده از ژینوژنزیز و آندروژنزیز می‌توان مکانیسم و فاکتورهای تعیین‌کننده جنسیت در ماهی را به خوبی توصیف کرد. اگر ماهیان نر هوموگامت (homogametic sex) باشند، وقتی ماهی آندروژنز تولید می‌گردد ماهی

فوق ۱۰۰ درصد نر (ژنوتیپ ZZ) خواهد بود. اگر ماهی نر هتروگامت باشند، ماهیان آندروژن YY و یا XX تولید خواهد شد که می‌تواند منجر به تولید هر دو جنس نر و ماده گردد.

همزمان با مطالعات ژینوژنزیز می‌توان ماهیان تری‌پلوئیدی (3N) تولید کرد و تنها تفاوت در روش کار این است که بجای اسپرم اشعه دیده شده از اسپرم معمولی جهت لقاح استفاده می‌گردد ولی شوک‌های فیزیکی (سرما، گرما و فشار) همانند ژینوژنز می‌توان استفاده نمود.

مزایا متعددی برای ماهی تری‌پلوئید وجود دارد. اولاً ماهیان تولید شده عقیم بوده و از لحاظ کروموزومی دارای سه دسته کروموزوم می‌باشند و گنادهای جنسی این گونه ماهیان یا تکامل نمی‌یابد و رشد نمی‌کند و یا در صورت رشد خاصیت باروری ندارند. لذا این گونه ماهیان را برای رهاسازی در آبگیرهای طبیعی می‌توان استفاده نمود و هیچ نگرانی برای تکثیر طبیعی و یا تولید ماهیان دورگه با ماهیان بومی وجود نخواهد داشت. در بعضی از گونه‌ها سرعت رشد ماهیان 3N به ویژه پس از رسیدن به سن بلوغ بیشتر از ماهیان 2N است دلیل اصلی این امر این است که ماهی ها انرژی خود را به جای صرف در رشد اندامهای تناسلی و تولید گامت، برای سایر بافت ها و اندامها بکار می‌برند لذا میزان بازدهی محصول در ماهیان 3N بیشتر از 2N است ولی برخلاف انتظارات اولیه در بعضی از گونه‌ها مثل کپور معمولی سرعت رشد ماهی ها 3N کمتراز 2N گزارش شده است (Cherfas *et al*., 1994).

انجماد اسپرم(اسپرماتوفور) و جنین

(Spermatophore & Embryos cryopreservation):

به جهت رشد روز افزون جمعیت و افزایش نیا زبه غذا صنعت تکثیر و پرورش ابزیان درسالهای اخیر رشد چشمگیری داشته که این خود وابسته به وجود مولدینی با صفات ژنتیکی قابل قبول می باشد. از طرفی به جهت پاره ای از عوامل (الودگیها ، تخریب زیستگاهها و..) ذخایربسیاری موجودات از جمله ابزیان به شدت کاهش یافته و درمعرض انقراض قرار گرفته اند . بدین علت کنوانسیونهای مختلفی با هدف حفاظت از این گونه ها شکل گرفته است. هرچند بازگرداندن شرایط طبیعی محیط زیست و بازسازی ذخایر در اولویت امور قرار دارند اما پیشرفت علم مباحث جدیدی در علوم زیستی ایجاد نموده است که به کار گیری انها گام بزرگی در جهت

توسعه صنایع مختلف از جمله ابزی پروری می باشدکه از ان جمله می توان به بیوتکنولوژی انجماد اسپرم اشاره نمود. نگهداری اسپرم و جنین ابزیان در دمای پایین (همچون نگهداری درنیتروژن مایع) به جهت کاربرد ان در مبحث ابزی پروری وتنوع زیستی از اهمیت بالایی برخورداراست. به کار گیری انجماد اسپرم و جنین مزایایی دارد که از جمله می توان به موارد زیر اشاره کرد: عدم همزمانی رسیدگی تخمک و اسپرم ، در هیبرید گیری گونه هایی که تکثیر همزمان ندارند، امکان استفاده از اسپرم نر ماهیان تغییر جنسیت یافته، کم بودن جمعیت ماهی نر، تبادلات بین المللی اسپرماتوزا .... مورد استفاده قرار می گیرند(صفری،۱۳۸۶).

انجماد اسپرماتوفور در میگو شامل مراحل زیر است:

بعد از جمع آوری اسپرماتوفورو انجام آزمایشهای سنجش کیفیت غلظت و تحرک، اسپرماتوفورهایی که بیش از ۸۰ درصد تحرک دارند برای انجماد انتخاب می شوند.

۱. .اضافه کردن رقیق کننده برای کاهش غلظت و تراکم غلظت اسپرم ها.

۲. اضافه کردن مواد محافظ ،این مواد می تواند به داخل سلول نفوذ کنند که آنها را نفوذ کننده می نامند (مثلDMSO) و یا نفوذ نا پذیر باشند مثل گلیسرول. همچنین مواد دیگری مثل زرده تخم مرغ و سایر مواد که به عنوان محافظت کننده ی غشا هستند نیز به کارمی روند.

* اسپرمها داخل پایوتها پرمیشوند.

۳. زمان هم دمایی که بیشتر در پستانداران کاربرد دارد در مورد ماهیا ن این زمان کاربرد چندانی نداشته و بعضی محققین در شرایط کاربرد گلیسرول از این زمان استفاده می کنند.

* انجماد اسپرم پروسه ای تدریجی می باشد

۴. نگهداری سلولها در بخار ازت مایع در حد ۲-۵ سانتیمتری بالای ازت در حد ۸۰- درجه سانتی گراد

۵. نگهداری نهایی به صورت غوطه وری نمونه ها در ازت مایع (۱۹۶-)

*انجماد زدایی: بر خلاف انجماد پروسه ای سریع است.

۶. گرمادهی وانجماد زدایی نمونه ها باید سریع باشد تا حداقل صدمه به سلول وارد شود. این دما معمولا در حد ۳۰-۴۰ درجه و به مدت ۳۰ ثانیه می باشد.

۷. اختلاط سریع نمونه های انجماد زدایی شده با تخم جهت لقاح و در صورت نیاز اضافه کردن محلولهای فعال کننده

مشخصه اسپرم هر گونه مختص همان گونه می باشد و حرکت انها توسط اب یا محلولهای مختلف امکانپذیر است. رقیق کننده ها برای کاهش غلظت و تراکم غلظت اسپرم ها.استفاده می شوند و باید مخلوطی مناسبی ازانواع مواد معدنی با PH و اسمولاریته مناسب باشد تا بافشار اسمزی قابل تحمل اسپرمها تضادی نداشته باشد. همچنین باید بتواند از تحرک اسپرمها ممانعت به عمل اورند. زیرا چنانچه اسپرمها فعال شوند بسرعت میزان ATP آنها کاهش می یابد. عامل حرکت به دو فاکتور غلظت یونی و فشار اسمزی محلول بستگی دارد. در ماهیان اب شور هنگام اسپرم ریزی فشار اسمزی مایع سمینال نسبت به فشار اسمزی دریا کمتر است. بنابراین اب سلول به خارج منتقل می شود. این پدیده دراسپرم ریزی ماهیان آب شیرین برعکس است.

کنترل PH نیز یکی از مهمترین بخشهای تهیه محلولهای رقیق کننده به شمار می اید . باید به خاطر داشت PHدر اسملاریته نقش دارد. (در واقع نشان دهنده غلظت پروتونهای با بار مثبت است.)از طرفی ترکیب داخلی سلولها تحت تاثیر انزیمهایی کنترل میشود که هر یک در PH خاص کار کرده و کار داخلی سلول را کنترل می کنند. بنابراین باید با استفاده از بافر PH را در حد دقیقی تحت کنترل داشته باشیم.

برای کاهش اسیبهای وارده به سلول باید از تشکیل بلورهای یخی تا حد امکان جلوگیری کردکه این کار را باید با افزودن مواد محافظ سرما به محصول باید انجام داد. در این رابطه این مواد را به دو نوع کلی تقسیم می کنند:

مواد نفوذ کننده و مواد غیر قابل نفوذ

افزودن مواد نفوذ کننده سبب کاهش سرعت تبدیل اب به کریستالهای یخی شده سرعت کاهش حجم سلول را کند کرده ودمای تشکیل بلورهای یخی را نیز پایین می اورد. ضمن انکه شدت رشد کریستالهای یخی ایجاد شده را کمتر کرده و باعث افزایش دمای تشکیل بلورهای یخی می گردد(Meryman, 1971). از مهنترین این مواد می توان از DMSO نام برد که در ماهیان خاویاری و برخی دیگر از ماهیان به خوبی جواب داده است(. مواد نوع دوم در خارج از غشا قرار میگیرندو با ایجاد یک لایه محافظ به اسپرم ها کمک می کنند. این مواد چون نمی

توانند به داخل سلول نفوذ کنند برای استفاده از انها باید زمانی را جهت هم دمایی و متعادل سازی در نظر گرفت(Rudolph and Crowe, 1985).

از مهمترین این مواد میتوان از ساکاروز و دکستران و چربیها ...نام برد. این مواد سبب کاهش نقطه انجماد کاهش دمای ایجاد بلورهای یخی خارج سلولی و کاهش صدمات وارده بر دیواره سلولی شده و گاهی به صورت ترکیب با مواد نوع اول به کار می روند. باید تاکید کرد که هر یک از مواد یا ترکیب انها بر روی گونه خاصی کاربرد دارد و از یک ماده نمی توان برای کلیه ابزیان استفاده کرد.

برخلاف موفقیتهای چشم گیر در انجماد جنین پستانداران(Whittingham *et al.*,1972) و حشرات (Mazur *et al.*, 1992) تلاش برای انجماد جنین بی مهرگان دریایی با موفقیت کمی همراه بوده است. درحضور مواد کرایوپروتکتنت مناسب جنین *Penaeus semisullcatus* دمای کمتر از۱۰- را برای مدت کمتر از ۶ ساعت و ناپلی *Penaeus indicus* دمای کمتر از ۴۰ – درجه را تحمل کند(Subramoiam and Newton 1993, Subramoiam, 1994)

مطالعه تاثیر کرایوپروتکتنتها ، سرد کردن و انجماد بر جنین و ناپلی *Penaeus esculentus* توسط Preston و Coman نشان دادند که جنین هم در مرحله ابتدایی وهم انتهایی به سرد کردن و تغیرات اسمزی حساس است و این به عنوان سد مهمی در انجماد کند به شمار می اید. تحمل به دمای۱ – درجه به ندرت بالاتر از ۲۰ دقیقه بود. قرار گیری در معرض مواد هیپرتونیک و هیپوتونیک برای جنین در هر دو مرحله کشنده بود. تحمل به کرایوپروتکتنتها بر اساس وزن مولکولی و غلظت کرایوپروتکتنتها متفاوت بود. همچنین نتایج نشان داد که جنین *Penaeus esculentus* دمای زیر صفر را در غیاب یخ تحمل می کند. و حضور یخ درون و بیرون سلولی برای جنین و ناپلی مرگبار است.

شواهدی وجود دارد که تحمل ناپلی نسبت به سرد کردن ازجنین بالاتر است که به محتوی زرده جنین بر می گردد(Subramoiam, 1994) .

انتقال ژن

همه صفات وابسته به ژنها هستند. بعضی صفات پلی ژنیک هستند. بعضی ژنها توانایی کنترل چند صفت را دارند و از طرفی عمل تثبیت و حذف ژنها پایه و اساس اصلاح نژاد موجودات است. در گذشته این عمل از طریق

مشاهدات انجام می شد بدین ترتیب که یک گونه با گونه دیگر ترکیب می شد و نسل حاصله بررسی می گردید، و به همین دلیل پدیده ای زمان بر به شمار می رفت. امروزه این عمل از طریق انتقال ژن انجام می گیرد. به موجود انتقال ژن شده ترانسژنیک (Transgenic) می گویند. بسته به هدف، ژن مورد نظررا انتخاب می کنیم. در ابزی پروری ژن هورمون رشد، ژن انتی فریزینگ، ژن استراز(پرورش در قفس) ، ژن مقاومت به بیماری از ژنهای مهم به شمار می ایند. در دهه گذشته پرورش میگو به جهت مواجه با انواع ویروسهای خطرناک شامل White spot baculovirus، yellow head virus ، Taura syndrum virus با چالشهای زیادی مواجه شده است (You et al., 2004). اما هیچ دارو یا ماده شیمیایی مفیدی برای درمان این ویروسها وجود ندارد. استراتژیهایی که به طور معمول در جلوگیری از بیماریهای میگو استفاده می شود شامل واکسیناسیون ، قرنطینه و مدیریت محیط می باشد(Xiang, 2001) . این راهکارها غیر اختصاصی بوده و نمی توانند توانایی میگو را در مواجهه با پاتوژنهایی که در اینده با مواجه می شوند یا حتی با پاتوژنهای مشابه تقویت نمایند. از انجا که میگو ها توانایی تولید انتی بادی ندارند راههکارهایی که بر اساس واکسیناسیون عموما در میگو پاسخگو نمی باشند (Glinski and Jaroz, 1997) . بنابراین کاهش صید میگوهای سالم و تاثیر بیماریهای ویروسی موجب شده تقاضا ها به سمت روشهای پیشرفته بیوتکنولوژیکی برای کنترل بیماریهای میگو پیش برود.انتقال ژن ابزار قدرتمندی دربهبود صفات مطلوبی همچون رشد و مقاومت به بیماری به شمارمی اید(Bachere *et al*., 1995) .

زمان انتقال ژن بسیار مهم است و باید قبل از اولین تقسیم جنینی (Cleavage)،بعد از لقاح باشد.

کلون کردن ژن

- شناسایی ژن مورد نظر(بخشی از توالی DNA با ارایش مشخص)
- تخلیص ژن مورد نظرتوسط انزیمهای برش دهنده
- تکثیر ژن مورد نظرتوسط PCR و یا پلازمید
- پروسه انتقال ژن

روشهای انتقال ژن

Microinjection (ریزتزریق درون هسته تخم)

این روش در بسیاری از گروههای جانوری از جمله حشرات، خیار دریایی، ماهی(Horvath and Orban, 1995)، میگو(Preston و همکاران (۲۰۰۰))پاسخگو بوده است همچنین کارایی بالای این روش نقیصه زمان بر بودن این روش نسبت به سایر روشها جیران می کند (Preston و همکاران ۲۰۰۰).

Electroporation ایجاد شکاف توسط الکتریسیته و انتقال ژن به تخم

این روش در تعداد کمی از حشرات(Kamadar *et al*., 1992) ، ماهی(Muller *et al*., 1993) ، ابالون(Power., 1995) استفاده گردیده و مشخص شده که شرایط Electroporation بسته به پوشش و لایه های جنینی هر گونه متفاوت می باشد(Preston و همکاران (۲۰۰۰)).

Co-percipitiation ایجاد شکاف توسط مواد شیمیایی و انتقال ژن به تخم

روش پروتوپلاست- اسفوروپلاست

روش Bombardment

روش بمباران در میگوی ژاپنی (Preston و همکاران (۲۰۰۰))، در بعضی crustasea (Gendreau *et al*., 1995) ، و ماهی (Zelenin *et al*., 1991) موثر واقع شده است.

وکتور یا ناقل که بهترین ناقل اسپرم است.

گزارشی در موردد تکامل میگوهای پنئیده منتشر نشده ، اما DNA با موفقیت به وسیله روش Microinjection به تخم میگو تزریق شده است(.Preston and Atkinson, 1995; Gendreau *et al*., 1991) و ژن(GUS) β- glucuronidase بعد از تزریق DNA خارجی در میگو بیان شد(Rothlisberg, 1998)

Arenal و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی تاثیر توالی مناطق هسته ای(NLS) انتی ژن sv40 در ورود ناقل DNA به جنین سخت پوستان (Litopenaeus schmittti) دریافتند که درگروه محتوی (NLS) محصول انتقال ژن شده دو برابرگروه فاقد (NLS) می باشد.

Lu و همکاران(۲۰۰۵) ژن مقاومت به بیماری taura را به میگو منتقل کرد و بقا بالاتری (حدود ۸۳ درصد) را نسبت به گروه کنترل (حدود ۴۴ درصد) مشاهده کردند. در حالیکه نرخ رشد، ظاهر، مرفولوژی ، فعالیت شنا و خوردن بین دو گروه اختلاف معنی داری را مشاهده نکردند.

Preston و همکاران (۲۰۰۰)در مطالعه مقایسه روشهای- Microinjection،Electroporation و بمباران در معرفی DNA به جنین میگوی ژاپنی، روش Microinjection را روش مناسبتری در انتقال دانست.

٦-١- روشهای کلاسیک و مدرن و دستکاریهای ژنتیکی در سطوح بهگزینی

اصلاح نژاد

اصلاح نژاد بوسیله انسان عملا بلافاصله بعد از اهلی شدن انها بر اساس عملکرد ظاهری و فنوتیپ دامها در طی قرن ها ی متعدد انجام و روند خیلی کندی داشته است. انتخاب طبیعی فرایند نسبتا کندی است که دران شایستگی حیوانات در محیطهای خاص معیار انتخاب بوده است، این فرایند طبیعی به همراه انتخاب مصنوعی که طی هزاران سال دانسته یا نادانسته توسط بشر صورت گرفته ، منجر به پیدایش نژاد و گونه های امروزی شده اند، که روند سریع آن بعد از پیدایش علم ژنتیک و ایجاد هیبریدهای مختلف صورت گرفته است.

روند تکامل و افزایش تولیدات دام از بدو اهلی شدن تا به امروز شامل ۲ مرحله اصلی و متمایز است:

مرحله اول : قبل از پیدایش علم ژنتیک و اصلاح نژاد یک مرحله نسبتا طولانی و چندین هزار ساله را شامل می شود تا اوائل قرن نوزدهم ادامه داشته و تغییرات بطئی، اما پایدار در تکامل را سبب شده است.

روبرت بک ویل در قرن هیجدهم نشان داد که هوش و خلاقیت انسان می تواند می تواند نیروی تعیین کننده در تفسیر گونه ها باشد. وی رکورد حیوانات را ثبت نمود و از طریق خویش امیزی افراد و تثبیت بعضی از صفات مطلوب در فرزندان عملا اقدام به اصلاح نژاد نمود و به عنوان پدر علم اصلاح نژاد شناخته شد.

برادران گلینگ ، بعد از بک ویل و با الهام از اقدامات وی نژاد شورت هورن را پایه گذاری کردند و اولین کتاب انساب گاو در سال ۱۸۲۲ بوجود اوردند.

مندل در سال ۱۸۶۵ با انجام آزمایش بر روی صفات ساده در گیاه نخودفرنگی نحوه توارث صفانت را مشخص نمودو پایه گذار علم ژنتیک شد. همه دانشمندان ژنتیک مدیون اقدامات و کشفیات مندل هستند.

مرحله دوم: بعد از پیدایش علم ژنتیک و اصلاح نژاد که مرحله نسبتا کوتاهی یعنی تا حدود ۱۰۰ ساله را شامل می شود که روندی سریع و تصاعدی داشته و دستاوردهای ان حتی چندین برابر دستاوردهای چند هزار ساله می باشد.

ویلیهام باتسون در سال ۱۹۰۱ اصول توارث و قوانین را در جوجه ها نشان داد و اثبات کرد که کشفیات مندل در حیوانات نیز مانند گیاهان اساس توارث بین نسلها می باشد. ، وی همچنین اصطلاحات هتروزایگوت، هموزایگوت را برای اولین بار ارائه نمود.

ویلیهم جانسون در سال ۱۹۰۶ عنوان کرد که ژنتیک مندلی پایه و اساس رشته مهم کاربردی اصلاح نژاد دام یعنی ژنتیک جمعیت و ژنتیک کمی می باشد. وی همچنین اصطلاحات ژن ، ژنوتیپ و فنوتیپ را ارائه نمود.

انجمن بهبود گاوهای شیری در سال ۱۹۰۶ در ایالت میشیگان امریکا در سال ۱۹۰۸ در نیویورک بوجود آمد.

هاردی ریاضی دان انگلیسی و واینبرگ پزشک المانی در سال ۱۹۰۸ با همکاری هم اصول ژنتیک جمعیت را در طراحی و استراتژی برنامه های انتخاب را برای افزایش فراوانی نسبی ژنهای مطلوب و کاهش یا حذف ژنهای نامطلوب ارائه دادند و قانون هاردی- واینبرگ یا قانون تعادل جمعیت ، یکی از بحثهای مهم و اصول پذیرفته شده در ژنتیک می باشد.

فیشر انگلیسی و رایت در سال ۱۹۲۰ پلی بین اصول اولیه ژنتیک و تکنیکهای اماری بوجود اوردند.

گالتون و پیرسون با استفاده از روشهای اماری همبستگی و رگرسیون، میزان ژنهای مشترک والدین با فرزندانشان و با نسلهای اینده را محاسبه و فرمولهای مربوطه را ارائه دادند.

جی لاش در سال ۱۹۳۲ فرضیه علم ژنتیک و آمار را ارائه داد و پایه گذار اصلاح نژاد علمی و مدرن شد و پدر اصلاح نژاد مدرن لقب گرفت.

هاندرسون در سال ۱۹۴۹ بهترین پیش بینی نا اریب خطی را در پیش بینی ارزشهای حیوانات پیش بینی کرد و بعد از ان حدود ۳۰ سال روشهای ارزیابی را بهبود داد و کمک شایانی به اصلاح نژاد نمود.

روبرتسون در سال ۱۹۵۰ در خصوص اندازه موثر جمعیت و تاثیر ان در محدودیت انتخاب کارکرد.

فریزر در سال۱۹۵۷ برای اولین بار تکنیک مدل سازی کامپیوتری در تقیقات ژنتیک و اصلاح دام را ارائه داد(رسولیان، ۱۳۷۹).

برخلاف دام و محصولات گیاهی که بهبود تولید انها بر اساس ژنتیک مدرن حاصل شده است ، تنها نمونه های موردی برخی ازماهیان و به طور محدودی میگو می توان ذکر نمود.

صفات اقتصادی صفاتی هستند که در تولید دامها ارزش پولی دارند. در مبحث اصلاح نزاد اگاهی از اختلافات فنوتیپی که به سه دسته کمی و کیفی وحد واسط طبقه بندی می شوند ضروری است.

صفات کیفی : Qualitive trait

به صفاتی اتلاق می شود که قابل اندازه گیری نیست و فقط می توان انها را مشاهده کرد. صفات توصیفی در دسته جات معینی قابل طبقه بندی می باشند. برخی از صفات کیفی به شکل ظاهری: الگوی رنگ، فلس، الگوی پیچش روده ،... و برخی از صفات کیفی به کمک روشهای ازمایشگاهی: خصوصیات بیوشیمیایی موجودات ، ویژگی ایمونوگلوبین ها و ...قابل مشاهده اند. مهمترین ویژگی صفات کیفی این است که تغییرات این صفات از هم متمایز و فنوتیپها کاملا از هم قابل تفکیک و نتاج قابل طبقه بندی اند، معمولا به وسیله تعداد محدودی (یک، دو ، سه ژن) کنترل می شود.

اثر انفرادی ژنها شدید است و هر ژن به صورت منفرد اثر خود را اعمال می کند با بررسی صفات در سطح افراد و تعیین نسبتهای جدید به دست می اید. صفات بر اساس قوانین ساده مندلی به ارث می رسند و امکان رسیدن به جمعیت هم سان زا true breed population در این تیپ صفات امکان پذیر است. این تیپ صفات بیشتر در پرورش ماهیان اکواریومی مد نظر است ، در مورد هر فنوتیپ ارزش جمعیت تولید و اصلاح نژاد شده موقعی به حداکثر خود می رسد که بتوانیم اعلام کنیم یک جمعیت هم سان زا ایجاد کرده ایم.

صفات کمی: Quantitive trait

به صفاتی اطلاق می شود که قابل اندازه گیری باشد و با واحدهایی همچون متر، گرم و.. مشخص شده اند، مثلا افزایش وزن بدن، تعداد تخم ها در هر تخم ریزی

این صفات پلی ژینیک بوده و برای انتقال ژن مربوط به این صفات با مشکلات زیادی مواجه ایم. بررسی صفت در سطح جمعیت صورت می گیرد. امکان رسیدن به جمعیت هم سان زا در این صفات بسیار دشوار است با

صفات ساده مندلی قابل درک نیست . این صفات غیر قابل تفکیک بوده و منجر به ایجاد گروهای معینی گردند، به عنوان مثال نمی توانیم بگوییم نتاج حاصل از یک مولد نر یک کیلوگرمی و یک والد ماده دو کیلوگرمی ، دو کیلو گرم یا یک و نیم کیلوگرم می شوند. این صفات مورد نظر پرورش دهندگان می باشند.

صفات حد واسط

صفات مریستیک همچون تعداد فلس روی خطجانبی، تعداد دندان حلقی ،.... وراثت پذیری این صفات حد واسط بین صفات کیفی و کمی می باشد.

۷-۱- روشهای کلاسیک اصلاح نژاد

- به گزینی (Selection)
- آمیزش خویشاوندی(Inbreeding)
- دو رگه گیری (Hybridization)

اغلب پرورش دهندگان میگو ، برای تامین ذخایر استخرهای پرورش مستقیما از پست لاروهای صید شده از دریا استفاده می کنند که ابهاماتی در مورد اثر فشار این برداشتها روی جمعیت (Bashirollah et al., 1989) ، ایجاد مشکلات صید ضمنی(Naylor et al., 2000) ، انتقال بیماریها (Lightner et al., 1998) و عدم امکان استفاده از روش های بهبود ژنتیکی و جود دارد (Argue and Alcivar-Warren, 2000). بدین منظور و برای کاهش و جلوگیری از ایجاد چنین مشکلاتی استفاده از روش های اصلاح نژاد و بهبود ژنتیکی می تواند سودمند باشد. هم اوری بالا، زمان تولید نسل کوتاه و پاسخ مناسب به انتخاب همراه با امیزش انتخابی مولدین اهلی تحت شرایط ایمنی زیستی ، فرصت را برای افزایش تولید در اکثرگونه های اقتصادی میگوی پنیید میگو به ویژه در نیمکره غربی را فراهم اورده است .(Browdy, 1998 ; Davis and Hatzel, 2000; Hatzel *et al*., 2000) .

در میگوی پنییده، کارهای ابتدایی ژنتیکی به اهلی کردن و پرورش در سیستم بسته مرتبط است و تلاشهای اخیر روی به گزینی صفاتی همچون رشد و مقاومت به بیماریها انجام گرفته است (Gyard *et al*., 2002 ;Argue et al., 2002; Hatzel et al., 2000) . به گزینی علاوه برتاثیر برصفاتی همچون میزان رشد، بقا، مقاومت به بیماریها می تواند

در بهبود سلامت ذخایر کمک نماید. تجارب و نتایج برنامه های به گزینی ژنتیکی و اصلاح نژاد که طی چند دهه گذشته در ماهی حاصل شده است به صنعت تکثیر و پرورش میگومنتقل نشده و لذا اطلاعات ژنتیکی و اصلاح نژاد در میگو مراحل ابتدایی را طی می کند و افزایش تولید و توسعه صنعت میگو در طی چند دهه گذشته اصولا به دلیل افزایش فاحش سطح استخرهای پرورشی بوده تا افزایش بازده تولید در واحد سطح. برنامه های امیزشی در دامها و ماهی نشان داده که برنامه های به گزینی (selection) با امیزشهای کنترل نشده و در جمعیتهای کوچک منجر به آمیزش خویشاوندی (inbreeding) و کاهش تنوع در جمعیتها شده است .(Bierne *et al*., 2000; Falconer, 1998)

۱-۷-۱- به گزینی (Selection)

انتخاب به عنوان فرایندی که در ان بعضی از افراد جامعه نسبت به افراد دیگر که ویژگیهای مناسبی دارند، برای تولید نسل ترجیح داده می شوند، تعریف می شود و وسیله ای مهم جهت تغییردادن فراوانی ژنی و ایجاد افراد با شایستگی بالاتر برای یک منظور ویژه می باشد. اصولا به گزینی بر اساس فنوتیپ صورت می گیرد و با توجه به فنوتیپ به ژنتیک موجود پی می برند . در ایران معمول این است که هر چه موجودی درشت تر و سرحالتر باشد مولد بهتری است، این ملاک نسبی بوده و همواره درست نمی باشد و عوامل بسیاری ممکن است در درشتی موجود موثر باشند، مثلا ممکن است ماهی عقیم باشد. از طرفی بحث Gene pool مطرح است بدین معنی که اگر هر کدام ازمولدین به یک چشم یک ذخیره ژنی نگاه گردد می تواند حامل صفاتی باشد که در دیگری نیست.

جهت انجام به گزینی کامل باید موارد زیر رعایت شود:

صفات انتخابی قابلیت وراثت داشته باشند.

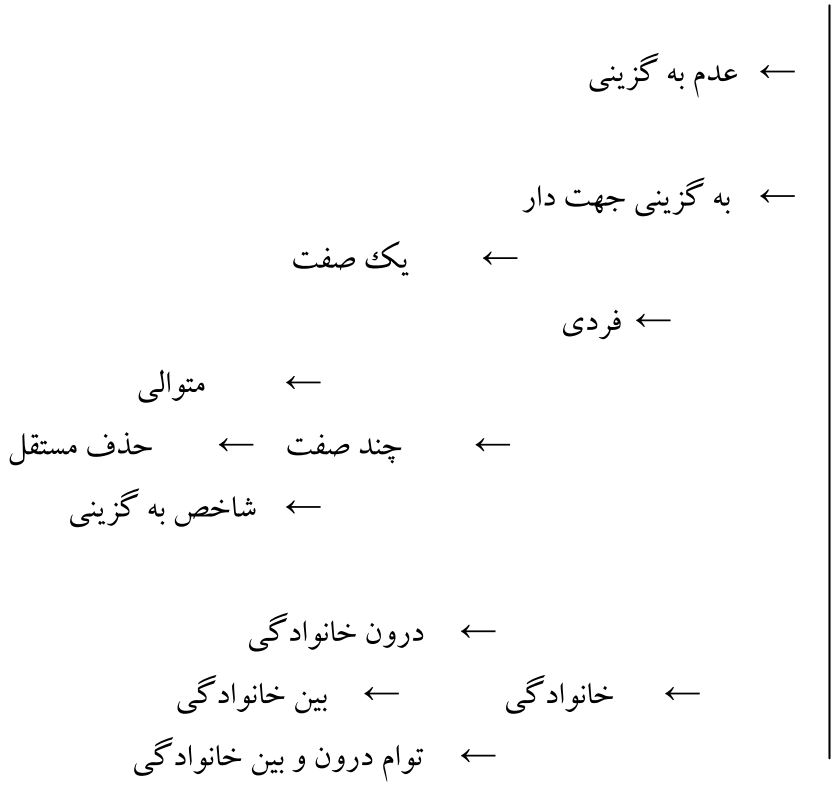
بهتر است در برنامه های به گزینی یکباره سراغ چند صفت نرویم، ابتدا یک صفت را تثبیت کرده و بعد سراغ صفت دیگری برویم.

واقع بین باشیم ، به نقایص ایجاد شده در نتاج دقت کنیم. با هر نقصی نمی توان گله را از گردونه خارج کرد.

صفتی را انتخاب کنیم که بوسیله ژنوتیپهای خالص کنترل شود. مثلا رنگ طبیعی قزل الا ی رنگین کمان

صفت انتخابی صفتی نباشد که بوسیله چند ژن کنترل شود.

تقسیم بندی به گزینی (انواع به گزینی)



در روشهای اصلاحی صفات در حیوانات ، با استفاده از انتخاب، معیار ارزشیابی خصوصیات فنوتیپی می باشد که طی نسلهای متمادی قابل تعقیب و اندازه گیری اند. اساس وراثت برای غالب این خصوصیات ، مخصوصا صفات تولیدی، تولید مثلی ، مقاومت به بیماریها و سازگاری بسیار پیچیده است. ایجاد پیشرفت ژنتیکی در این صفات به کمک متدهای پیچیده اماری و بر پایه اصول ژنتیک و تئوریهای ژنتیک جمعیت و ژنتیک کمی صورت می گیرد. این متدها هیچ گونه اطلاعی درباره ماهیت ژنهای کنترل کننده این صفات و نحوه عمل انها فراهم ننموده و از تعداد جایگاهها و اللهای دخیل در هر صفت نیز نشانه ای به دست نمی دهد. بنابراین جریان اتفاقات ژنتیکی در هر کدام از افراد حیوانی از نظر وضعیت پیوستگی ژنی و تقاطع کروموزومی مشخص نیست و عوارض نامطلوب انتخاب در دراز مدت قابل پیش بینی نمی باشد. در این روشها امکان خسارات و صدمات جبران ناپذیر به یک نژاد و یا گونه حیوانی وجود دارد. پیدایش و تکامل روشهای جدید ژنتیک مولکولی تشریح دقیق ژنها و نحوه عمل انها را ممکن نموده است. امروزه روشهای به گزینی ژنوتیپی مورد مطالعه قرار گرفته اند. برنامه اصلاح نژاد بر اساس خصوصیات ژنوتیپی شیوه ای نو در ابزی پروری است و سابقه طولانی در ماهی ازاد و

صدف خوراکی دارد.این دستاورد هنوز درمراحل ابتدایی خود قرار دارد زیرا فعالیت ژن در بیشتر گونه ها نا مشخص بوده و یا تشخیص داده نشده اند. این علم بر مبنای اطلاعات محل ژن ، ساختارDNA و یا تشخیص اطلاعات ژن یک ناحیه از DNA می باشد. این اطلاعات سپس در برنامه های اصلاح نژادی برای تولید فرزندانی که از لحاظ لوکوسهای کمی (QTL) غنی هستند بکار می روند. استفاده از DNA برای اصلاح نژاد میگو نیز مورد توجه قرار گرفته است. در این راستا استفاده از مایکروساتلایتها اهمیت پیدا کرده است. مثلا در تشخیص گونه وانامی از سایر میگوها و همچنین تعیین تنوع کاربر دارد که بر اساس ان می تواند هم در انتخاب بر اساس فنوتیپ و هم در برنامه های اصلاح نژادی به کاررود. همچنین می توان ژنها را به صورت مولکولهای DNA از ژنوم جدا و پس از تغییر و تبدیل در ازمایشگاه مجددا به ژنوم موجود برگرداند. انجانم چنین تغییراتی که اصطلاحا تکنولوژی DNA نوترکیب (Recombinant DNA Technology) یا مهندسی ژنتیک لقب گرفته است . راههای انتقال ژنهای جدید وبیگانه را به ژنوم موجودات هموار ساخته و به کار گیری روشهای نوین را در اصلاح نژاد دام باعث شده است. اساس این روشها بر شناخت کنترل ژنتیکی صفات اقتصادی در سطح DNA و استفاده از این اطلاعات برای انتخاب حیوانات برتر است. انتخاب بر پایه اطلاعات ژنوتیپی خطرات ناشی از انتخاب فنوتیپی ، از قبیل کاهش عمومی واریانس ژنتیکی ، اللهای غالب و کشنده و فشار هم خونی را در جمعیتها کاهش می دهد.

به گزینی جهت دار فردی برای یک صفت Mass selection

در این روش در شروع کار مولد سازی احتیاج به نمونه های زیادی داریم (جمعیتهای مختلف با علم به اینکه نمونه ها خواهر و برادرند)، شرایط محیطی برای همه آنها یکسان است و سورت نمونه ها بر اساس پارامترهایی همچون طول انجام می گیرد. این عمل چندین سال انجام میگرد تا به گزینی کامل شود.

به گزینی جهت دار فردی برای چند صفت متوالی Tandem selection

دربه گزینی متوالی چند صفت مد نظر است. در این روش بعد از مشخص کردن صفات، بر اساس درجه اهمیت صفات ، انها را تثبیت می کنیم .

به گزینی جهت دار فردی برای چند صفت حذف مستقل Independent cutting

در این تکنیک همزمان دو صفت را cut off value می نماییم، مثلا ماهیانی که حداقل ۵۰ سانتی متر طول و حداقل ۵۰۰ گرم وزن دارند. از معایب این روش این است که اگر موجود یکی از پارامترها را نداشته باشد باید حذف گردد.

شاخص به گزینی Selection Index

برنامه های اصلاحی معمولا بر روی چند صفت بطور همزمان می باشد که صفات بدلیل داشتن ارزش ژنتیکی – اقتصادی متفاوت ، نمی تواند مورد اهمیت یکسان قرار گیرد. از ترکیب چند صفت ، ارزش نهایی افراد به دست می آید بدین ترتیب که با ترکیب نمودن اندازه های به دست امده برای صفات مختلف هر فرد یک رقم (ایندکس) به دست می اید که اساس انتخاب می باشد، برای پیاده نمودن چنین روشی باید از میزان وراثت پذیری مربوط به هر صفت و نیز همبستگی ژنتیکی وفنوتیپی بین صفات و نیز ارزش اقتصادی مربوط به هر صفتی را می بایست اطلاع داشت. پس از اتخاب ضریب و میزان هر صفت در موجود نمره ای به او داده نمی شود که آنرا ملاک انتخاب قرار می دهیم . این سیستم کاملا عملی و کاربردی می باشد.

میانگین فنوتیپ مورد مطالعه در جمعیت اهمیت نسبی فنوتیپ مورد مطالعه = فاکتور اهمیت

در برنامه های اصلاح نژاد ، شناخت و محاسبه تغییرات ژنتیکی به تغییرات فنوتیپی موجود در یک صغت کمی بسیار مهم است. این نسبت اصطلاحا وراثت پذیری نامیده می شود که با حرف (h^2) نمایش داده می شود.میزان وراثت پذیری بین ۰–۱ قابل تغییر است . فنوتیپهاایی که مقادیر وراثت پذیری انها معادل ۰,۲۵ یا بیشتر از ان است می توانند بوسیله بهگزینی بطور موثری تغییر نمایند و فنوتیپهای معادل ۰,۱۵ یا کمتر از ان به سادگی بوسیله بهگزینی تغییر نمیکنند و اصولا هر قدر (h^2) بزرگتر باشد تغییر میانگین جمعیت بوسیله بهگزینی اسانتر خواهد بود.

میانگین وزنی گله – میانگین وزنی دو والد جدید= S دیفرانسیل به گزینی

میانگین وزنی جمعیت اولیه – میانگین وزنی نسل R = F1 پاسخ به گزینی

وراثت پذیری (h^2)= R/S

به گزینی خانوادگی

هرگاه به گزینی فردی تنواند ما را به اهداف خود برساند به سراغ به گزینی خانوادگی می رویم و برای صفاتی کاربرد دارد که وراثت پذیری کمتر از ۱۵ درصد دارند. موثر بودن این روش به این علت است که انتظار می رود تفاوتهای محیطی برای افراد یک فامیل با در نظر گرفتن میانگین فامیلی همدیگر را خنثی نماید و د رنتیجه میانگین فنوتیپی فامیل معرف خوبی برا ی میانگین ژنوتیپی فامیل باشد و هر قدر تعداد افراد فامیل زیادتر باشد درجه تطابق میانگین فنوتیپی یا میانگین ژنوتیپی افزایش می یابد.

به گزینی بین خانوادگی

در این روش Cut off value را برای هریک از خانواده ها حساب می کنیم. میانگین را محاسبه نموده . مقادیر را به ترتیب اهمیت دسته بندی می کنیم. خانواده با حداقل Cut off value را حفظ و بقیه را حذف می کنیم.

عیباین روش این است که اگر چه ماهی ممکن است ماهی پارامترهای حداقل را داشته باشد ولی چون در خانواده با میانگین پایین قرار گرفته ناچار به حذف آن می باشیم.

به گزینی درون خانوادگی

در این تکنیک هر خانواده به چند زیر خانواده تقسیم می شود وبعد به گزینی انجام می گیرد.

به گزینی بین و درون خانوادگی: ابتدا بهترین خانواده را جدا و بعد آن را به چند زیر خانواده تقسیم می نماییم و در این زیر خانواده ها بهترین ها را برای انتخاب نهایی، جدا سازی میکنیم ، این بهترین حالت در به گزینی خانوادگی است.

۲-۷-۱-آمیزش خویشاوندی

پرورش خویشاوندی سیستم امیزشی است که در ان نتاج به وسیله والدینی تولید می شوند که در مقایسه با میانگین جامعه ای که از ان می ایند ، بیشتر خویشاوند هستند. از نظر ژنتیکی امیزش خویشاوندان نزدیک موجب خلوص ژنتیکی یا هموزایگوسیتی می گردد. در امیزش خویشاوندان ان دسته ازاللهایی که ازجد مشترک به انها

رسیده امکان جفت شدن و بروز را پیدا می کنند. در این حالت فرزندان ایجاد شده در بعضی از لوکوسها خالص می شوند و در اصطلاح به این عمل هم خونی (Inbreeding) می گویند. ازانجا که امیزش خویشاوندی خلوص ژنتیکی را ا فزایش می دهد ، در اثر کاهش تعداد افراد ناخالص، تعداد افراد خالص زیاد می شوند و فراوانی ژنوتیپی تغییر می کند. درحقیقت پرورش خویشاوندی یا افزایش هموزایگوسیتی، ژن های غالب را اشکار نمی کند، چون افرادی که هتروزایگوت و یا هموزایگوت غالب هستند، اثر ژن غالب را نشان می دهند و در اکثر موارد هیچ تفاوتی در فنوتیپ افراد هتروزایگوت یا هموزایگوت غالب وجود نداشته و اگر هم وجود داشته باشد بسیار جزیی است. اما پرورش خویشاوندی این احتمال را که حیوانی حامل ژنهای با یک اثر غالب به صورت هموزایگوت (DD)باشند ، بیشتر از هتروزایگوت بودن انها(Dd)، افزایش می دهد. چون از نظر فیزیولوژیکی ژن های مغلوب اثرنامطلوبی دارند، لذا حذف حیواناتی که کمتر مطلوب هستند ، باید منجر به افزایش فراوانی ژنهای غالب یا مطلوب در جامعه شود. و این از مهمترین دلایل اصلاح گرهای دام در استفاده ازپرورش خویشاوندی می باشد و برای حذف نسبت بالایی ازحیواناتی که در گله کمتر مطلوب هستند ، اماده می باشند. این امر نیازمند ان است که برای به بوجود امدن یک لاین تعداد زیادی از دامها تولید شوند و بدین دلیل این کار بسیار پرهزینه بوده و در بسیاری موارد چندان عملی نیست .

همانطوریکه صفات مثبت امکان جفت شدن و بروز را پیدا می کنند، زمانی که آمیزش خویشاوندی از یک حدی بالاتررود ، ژنهای نامطلوب هم جفت می شوند و اثرات نامطلوب آنها را می بینیم اللهای مخرب می توانند روی فاکتورهای شایستگی اثر گذار باشند و در بسیاری از مواقع از طریق کاهش قابلیت زندگی لاروی، کاهش بقا طی حوادث مهم دوران زندگی ، کاهش سرعت رشد یا کاهش قدرت تولید مثل وافزایش ناهنجاری ها موجود را تحت تاثیر قرار می دهند . البته همانطوریکه درجدول ۷ آمده است ، هر دو نوع اثر مثبت و منفی ناخالصی مشاهده شده است، در حقیقت ناخالصی قابلیت فیزیولوژیک فرد را ، برای مقابله با تغیرات محیطی افزایش می دهد از این رو ممکن است فرد ناخالص در مقایسه با فرد خاص ، در شرایط محیطی متغیر دارای نمو ، بازماندگی یا رشد بهتری باشد. کاهش شایستگی در اثر پدیده درون امیزی به عنوان فشار درون امیزی نامیده می شود. مطالعات نشان داده همه جمعیتها درجاتی از درون امیزی را تجربه می نمایند (pante, 2001) . فشاردرون امیزی و اثرات منفی ان بسته به گونه ، سطح درون امیزی و صفت مورد نظر دارد (Bondari and Dunhum, 1987;

(Gjerde et al., 1993 and Bensten and Olesen, 2002. افزایش سطح درون امیزی ، فشار درون امیزی بارزتری را در پی دارد. سطح هم خونی که در ان فشار درون امیزی مشهود می شود ثابت نبوده ودر میان گونه های مختلف متغییر است. فشار درون امیزی به الل های خاص و فراوانی های اللی خاص در یک شجره نامه بستگی دارد. از این رو حساسیت نسبت به هم خونی می تواند در میان تیره ها و جمعیتهای یک گونه تغییر کند. ظاهرا حدودی از حساسیت نسبت به فشار هم خونی تقریبا در میان تمامی موجودات مطالعه شده وجود دارد. (لازلی،۱۳۸۰). امیزش خویشاوندی هتروزیگوسیتی را کاهش ، پتانسیل پاسخ به به گزینی را درنسل های بعدی محدود و فشار درون امیزی را افزایش می دهد(Bensten and Olesen, 2002). فشار درون امیزی با کاهش توانایی مورد انتظارصفات تحت تاثیر قرار گرفته (متوسط بین جمعیت پایه و درون امیز)مشخص می شود. صفاتی که فشار درون امیزی را نشان می دهند مولتی لوکوس یا صفات کمی مرتبط با ظرفیت تولید(هم اوری، سایز تخم و قابلیت هچ)و بازده فیزیولوژیکی(بدشکلی فرای، نرخ رشد، FCR و بقا) می باشند(kincaid,1983).

Keys و همکاران(۲۰۰۴) در مقایسه میزان بقا در میگوهای inbreed و outbreed دریافتند که در مراحل اولیه رشد میزان بقا در نتاج outbreed بالاتر ازinbreed می باشد ولی در مراحل دوم و سوم رشد این میزان برابر است. که نشان دهنده سطوح درون امیزی که می توانند به وسیله میگو تحمل شوند ولی می توانند موجب فشاردرون امیزی و کاهش تولید گردند. با توجه به تاثیر درون امیزی در تولید، بهتر است که برای کاهش فشار درون امیزی تنوع ژنتیکی ذخایر را بالا برده و به میزان درون امیزی در برنامه های به گزینی توجه نماییم.

نسل	فراوانی ژنوتیپی			فراوانی اللی	
	F(AA)	F(Aa)	F(aa)	F(A)	F(a)
P	۰/۲۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۵	۰/۵
F1	۰/۳۷۵	۰/۲۵	۰/۳۷۵	۰/۵	۰/۵
F2	۰/۴۳۷	۰/۱۲۵	۰/۴۳۷	۰/۵	۰/۵
.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.
F∞	۰/۵	۰	۰/۵	۰/۵	۰/۵

۳-۷-۱- دو رگه گیری Hybridization

در این روش بر خلاف امیزش خویشاوندی و به گزینی که هدف رسیدن به هموزایگوسیتی بیشتر است ، هدف رسیدن به هتروزایگوسیتی می باشد. زمانی که یکسری صفات مثبت بین دو والد مشاهده می کنیم و تمایل به به اشتراک گذاشتن مجموعی از این صفات در نسل بعد داریم استفاده می گردد.

در این تکنیک قرابت ژنتیکی، قرابت بیولوژیکی و امکان آمیزش متقابل بین دو والد باید مد نظر قرار گیرد . همچنین دو رگه گیری باید امکان تکرارداشته باشد. برای یک نسل مناسب است و نمی توان روی مولد سازی ان کار کرد. در مورد صفاتی که وراثت پذیری کمتر از ۱۵ درصد دارند مناسب است. بسیاری از دو رگه گیری های بین گونه ای در میگو با موفقیت انجام گردیده است،عدم موفقیت در بقیه دو رگه گیری ها هم ، به دلیل مکانیزم بسته تولید زایگوت اولیه (pre-zygot) و زایگوت ثانویه (pos-zygot)در میگو است و اگر این امر نیز انجام شود ، معمولا میگوی با اثرات هتروزیس در نسل F_1 برای صفت رشد و مقاومت تولید نمی شود و بطور کلی دو رگه گیری روش موثری برای ترکیب صفات مطلوب از گونه های متفاوت نمی باشد(Benzie et al., 1995)،

Boston & Provenzano (۱۹۸۲) در مطالعه دو رگه گیری در سه گونه میگوی پالمونیده دریافتند که در دو رگه گیری بین هیچ یک از گونه ها (*P. pugio, P. intermedius*, P. *vulgaris*) لاروی حاصل نشد ولی در دورگه گیری درون گونه ای *P. pugio* و *P. vulgaris* لارو تولید شد که لاروهای تولیدی از نظر نرخ بقا، مدت تکامل و اندازه پست لارو با هم اختلافی نداشتند ولی در ۴۰ روز بعد از تخم گشایی لاروهای حاصل از P. pugio به بالغین شبیه تر بودند. در *P. pugio* هر چه منطقه والدین (جمعیت های نر و ماده) از هم دور تر بود میزان باروری بیشتری را به دست می داد. تعداد مولد تخم ریزی کرده و درصد هچ و بقا تا مرحله PL20 در هیبریداسیون *P. monodon* * *P. esculentus* به ترتیب حدود ۱۵ ، ۲,۵ و ۴۷-۵۰درصد(Benzie *et al.*, 1995)، در *P. monodon* * *P. penicillatus* ۳۰-۱۰، ۳۰و ۵ درصد(Lin *et al.*, 1988)، در *P. Schmitti* * *P. setiferus* 30-40، ۰,۲ و ۴۷-۵۰درصد(Bray *et al.*, 1988) به دست آمد. با توجه به مطالعات انجام شده به نظر می رسد ارتباطی بین رابطه فیلوژنیک و موفقیت هیبریداسیون وجود ندارد(Benzie *et al.*, 1995).

روشهای دو رگه گیری

بین جنس : دو رگه بین فیل و استرلیاد که بستر نام دارد ، نسل اولیه عقیم نیست و از f_3 به بعد عقیم است.

بین گونه : دو رگه بین قزل الا و آزاد ماهی

داخل گونه : دو رگه بین کپور نژاد چینی و کپور تژاد مجارستانی

هتروزیس

برتری نسل دو رگه نسبت به والدین را هتروزیس می نامند. در دو رگه گیری هدف ایجاد افراد با هتروزیس مثبت (H^+) است، هرگاه H^+ بالاتر از ۱۵-۱۰ درصد باشد ، خوب است.

$H =$ میانگین صفت در ماهیان دو رگه - میانگین صفت در والدین / میانگین صفت در والدین *۱۰۰

درجات مختلف زادآوری در ماهیان دو رگه

تولید مثل طبیعی : نسل حاصله قابلیت تولید مثلی دارد. *Tilapia nilotica* T. honurum*

عقیمی زایگوتی: ماهی زایگوت سالم دارد، لقاح انجام می شود ولی جنین ها از بین می رود.

کپور علفخوار نر* کپور معمولی ماده

عقیمی گامتیک : گناد و گامت تشکیل می شود ولی گامتهای حاصله به واسطه شکل ظاهری و اندازه غر طبیعی اند.

فلاندر نر* کفشک ماده

عقیمی گنادی: گنادها کاملا رشد نمی کنند

قزل الای قهوه ای ♀ *قزل الای جویباری ♂ ← قزل الای خال خالی ببری (رشد خوب و خوش ظاهر)

تشخیص هیبرید

تفاوتهای مورفولوژیکی، تفاوتهای سیتوژنتیکی ، بافت شناسی ، تغییر شکل گلبولهای خونی ، شکل و اندازه گامتها ، بررسی اختلافات انزیمی با استفاده از الکتروفورز، بررسی اختلافات مولکولی در سطح DNA به کمک PCR می توانند در شناسایی هیبریدها به ما کمک نماید.

مراکز اصلاح نژاد در دنیا

امروزه شمار مراکز تحقیقاتی اصلاح نژاد دنیا رو به افزایش است .

از مهمترین مراکز اصلاح نژاد دام در دنیا می توان به مراکززیر اشاره نمود.

مرکز اصلاح نژاد دام در ایرلند nlbc.go.jp

مرکز اصلاح نژاد دام در هند wikimapia.org

دپارتمان علوم جانوری CUS در امریکا ansci.colostate.edu

مرکز تحقیقات کشاورزی فنلاند icar.org

از مهمترین مراکز اصلاح نژاد ماهیان نیز می توان به مراکز زیر اشاره نمود.

مرکز تحقیقات ماهیان دریایی جنوب چین china-fishery.net

مرکز تحقیقات ابزی پروری در ویتنام fistenet.gov.vn

مرکز تحقیقات شیلاتی (ابهای داخلی در ژاپن)read. Jst.go.jp

مرکز تحقیقات ماهیان اب شیرین چین lib.noaa.gov

مطالعات انجام شده در جهت اصلاح نژاد آبزیان

لانگ ول و استایلز(۱۹۷۳) کاهش شدیدی در قابلیت زندگی و کاهش خفیفی در سرعت رشد نوزادان حاصل از امیزش خواهر و برادری صدف های اویستر امریکایی، *Crassosstrea virginica*، مشاهده نمودند.

لانان (۱۹۸۰) هیچ گواهی مبنی بر تاثیر هم خونی بر بقای نوزادان صدف اویستر ژاپنی *Crassosstrea gigas* ، تا مرحله دگرگیسی مشاهده نکرد.

مالت و هال(۱۹۸۳)بقای بیشتری را (در اثر افزایش خلوص) در مرحله نوزادی صدف های اویستر امریکایی، عدم تفاوت بقا در اویستر های هم خون و غیر هم خون در مراحل جوانی تا بلوغ و سرعت رشد کمتری را در مرحله بلوغ صدفهای هم خون مشاهده کردند.

کینکاید (۱۹۸۳) با استفاده از جمعیتی غیر درون امیخته تیره های قزل الای رنگین کمان با درون امیزی ۵۹,۴-۱۲,۵ درصد را ایجاد و صفات مرتبط با شایستگی ازقبیل قابلیت زندگی(نرخ تفریخ و بقا)، صفات رشد(وزن و طول در هفت سن مختلف) و تولید مثل (وزن توده تخمکها و درصد تخریب انها) را اندازه گیری نمود و مشاهده کرد در سطوح هم خونی پایین ۱۲,۵ درصد صفات قابلیت زندگی تاثیر منفی و سرعت رشد تاثیر مثبت پذیرفت. در صورتیکه ترکیبات اللی مطلوبی در ژنوتیپ در کنار هم ارایش یابند ، در سطوح درون امیختگی اندک ممکن است سرعت رشد بهبود یابد، که این امر دررابطه با سطوح هم خونی بیشتر صدق نمی کند. در سطوح بالاتری از هم خونی یعنی ۱۸,۵ درصد و بیشتر ، تمامی صفات به جز تفریخ تاثیر منفی پذیرفتند. به علاوه در سطوح بالاتر درون امیزی ، فشار درون امیزی محسوس تر بود. شایستگی تولید مثلی که در قالب مقدار هم اوری اندازه گیری شده ، به مقدار قابل توجهی تحت تاثیر هم خونی بوده و در تیره ای که بیشترین مقدار درون امیزی را داشت ، به کمتر از نصف هم اوری شاهد ، کاهش یافته بود.

مطالعات انجام شده در جهت اصلاح نژاد میگو

Sbordoni و همکاران (۱۹۸۷) اولین گروهی بودند که به مطالعه تغییرات ژنتیکی که پس از چند نسل درون امیزی در گونه های میگو بوجود می اید پرداخته و با استفاده از الوزایم ها

دریافتند که تنوع ژنتیکی با درون امیزی پنئوس ژاپونیکوس بهگزین شده برای تخم ریزی سریع و وزن بالاتر ، از نسل اول تا پنجم کم می شود. این کاهش تنوع با کاهش نرخ هچ (در حدود ۸۰ درصد) مرتبط است که به فشار درون امیزی نسبت داده می شود.

کاهش تنوع ژنتیکی نسل هفتم جمعیتهای اهلی پنئوس وانامی در مقایسه با جمعیت وحشی این گونه با استفاده از میکروساتلایت مورد بررسی قرار گرفت . این محققان همچنین اعلام کردند که در صورت عدم مدیریت صحیح ، کاهش بیشتری در تنوع اتفاق خواهد افتاد.

Goyard و همکاران (۱۹۹۹) بعد از ۴- ۵ نسل رشد ۱۸ و ۲۱ درصدی را در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نمودند.

Hetzel و همکاران (۲۰۰۰) رشد ۱۰,۷ درصدی بعد از یک نسل به گزینی در*Mersupenaeus japonicus* مشاهده کردند. پاسخ به گزینی برای ماهی و میگو مشابه می باشد. برای مثال ، پاسخ به به گزینی برا ی صفت در صفت رشد برای کوهو ۱۰,۱% (Hershberger et al., 1990) ، برای گربه ماهی ۱۲-۲۰ % (Bondari, 1993; Dunham, 1987) و برای تیلاپیا۲۳ ٪(Gjedrem, 1997) گزارش شده است.

Argue و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه تاثیر به گزینی برای صفت رشد و صفت مقاومت به بیماری Taura در *litopeneus vanamei* میزان رشد در نسل اول این گونه را ۲۱ درصد بالاتر از گروه شاهد ، وراثت پذیری خویشاوندان ناتنی را0.43 ± ۸۴٪ تعیین کردند. ماده ها ۱۲,۷ درصد بزرگتر از نرها بودند. در گروه مقاوم به بیماری بعد از یک نسل ، میزان بقا ۱۸,۴ درصد نسبت به گروه شاهد افزایش یافت . بررسی وراثت پذیری نسبت جنسی در *litopeneus vanamei* نشان داد که این فاکتور در میگو صفرمی باشد ، که این متفاوت از نتایج وراثت پذیری ماهی و لاک پشت (که وراثت پذیری معنی داری را برای نسبت جنسی نشان می دهند) می باشد(Janzen, 1992).

Argu و همکاران(۲۰۰۲) در مطالعه تاثیربه گزینی بر رشد و مقاومت به سندروم ویروسی Taura در میگوی وانامی مشاهده کردند که که در لاینی که برای فاکتوررشد به گزین شده بود نرخ رشد افزایش یافت و در لاینی که برای فاکتور رشد و مقاومت به گزین شده بود نرخ رشد کاهش و مقاومت به بیماری افزایش یافت.

Corcos و همکاران(۲۰۰۲) در مطالعه تاثیر درون امیزی بر رشد، بقا و توانایی تولید مثلی لاینهای اهلی شده پنئوس ژاپونیکوس دریافتند که فشاردرون امیزی با وزن نهایی، بقا ، تعداد تخم ها در هر تخم ریزی و تعداد ناپلی های هر ماده در هر ماه در نسل F_4 و F_5 لاین های درون امیز در مقایسه با لاین های برون امیز مرتبط است.

Goyard و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه تاثیربه گزینی توده ای برای فاکتور رشد در میگوی ابی در استخرهای خاکی روند نوسانی را تا نسل چهارم مشاهده کردند ودر نسل پنجم نرخ رشد افزایش ۲۱ درصدی را نشان داد.

Keys وهمکاران (۲۰۰۴) در طول دو سال تولید درمقایسه تاثیر درون امیزی بر رشد و بقای *Mesopenaeus japonius* تحت شرایط کنترل شده مشاهده کردند که در مرحله اول رشد میگوهای درون امیزی کرده (PL_{80}-

PL_{30}-) بقا به طور معنی داری کمتر ازگروه شاهد بوده ، اما در مراحل بعدی رشد، دوم (PL_{80}— PL_{124}) و سوم (PL_{124}— PL_{156}) ، بیشتر ازگروه شاهد بود ولی این میزان معنی دار نبود.

Preston و همکاران (۲۰۰۴) در مقایسه رشد سه گروه *Mesopenaeus japonius* ، گروه اول فرزندان مولدین وحشی، گروه دوم فرزندان نسل اول مولدین اهلی شده که برای صفت ماکزیمم سایزدر زمان برداشت (۵ ماه در شرایط کنترل شده پرورش یافته اند.) به گزین شده بودند و گروه سوم فرزندان نسل اول مولدین وحشی که برای صفت ماکزیمم سایزدرزمان برداشت به گزین شده بودند و ۳ نسل در شرایط کنترل شده پرورش یافته اند، نتایج نشان داد در مقایسه با گروه اول ، در میانگین وزنی گروه دوم ۹/۳ درصد افزایش و در میانگین وزنی گروه سوم ۱۴درصد افزایش مشاهده شد.

Marcos و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه تاثیر به گزینی جهت دار برای صفت عاری از بیماری بودن (SPF) و درون امیزی بر پنئوس وانومی مشاهده کردند که میزان رشد، بقا و تولید افزایش پیدا کرده ومیزان FCR و دفرمیتی کاهش پیدا کرد.

Li و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه تاثیر به گزینی برای فاکتور رشد بر ساختار جمعیتی میگوی چینی با استفاده از مارکر RFLP مشاهده کردند که با گذشت زمان هم تنوع و هم تمایز در جمعیت میگوی چینی کاهش یافت.

برنامه های به گزینی و اصلاح نژاد به دلیل مشکلات تولید مثلی گونه های اصلی و کلیدی مانند *P. monodon*، همچنین مشکلاتی همچون علامت گذاری فردی میگو ، وراثت پذیری کم بعضی صفات همچون رشد(محیط تاثیر بیشتری روی رشد دارد) و از طرفی کم لطفی بخش خصوصی نسبت به این مطلب به تاخیر افتاده است و هنوز هم در بسیاری از کشورها تهیه لارو میگوی وحشی از طبیعت بهترین گزینه محسوب می گردد. در ژنتیک مدرن نیز مبحث میگوی تراریخته مطرح گردیده اما هیچ گونه پیشرفتی در این مورد گزارش نشده است. و اصولا هیچ گونه ابزی تراریخته ای توسط مزارع مورد قبول واقع نشده است.

سیتوژنتیک

سیتوژنتیک دانش دو رگه ای است که می کوشد رویدادهای سلولی، بویژه رویدادهای کروموزومی را به پدیده های ژنتیک ربط می دهد.توصیف کروموزوم های (تعداد ، اندازه و ریخت شناسی) موجود در هسته یک سلول کاریوتیپ نامیده می شود (استانسفیلد،۱۳۷۳)

در سخت پوستان داده های کروموزومی به دلیل تعداد زیاد و اندازه کوچک کروموزومها در مقایسه با حشرات و سایر مهره داران نسبتا کم است . بعد از مطالعه Hedgecock و همکاران (۱۹۸۲) یکسری اطلاعاتی در مورد ساختار ژنوم پنئیده اشکار گردید. اما این اطلاعات کم و سازماندهی نشده می باشد. سایز ژنوم ۴ گونه پنئوس بوسیله فلوسیتومتری ۷۰ درصد سایز ژنوم انسان تخمین زده شد(Chow *et al.*, 1990). ذکر این نکته ضروری است که مطالعات سیتوژنتیک می تواند در مطالعات دو رگه گیری امروزه به عنوان یک روش ژنتیکی برای معرفی ذخایر جدید پرورش، مناسب محسوب می شوند، گونه هایی که مقاوم به اب شیرین و شور و همچنین گونه های سریع الرشد ، مقائم به بیماری و صفات مطلوب دیگرمی باشند. همچنین از اطلاعات کاریولوژیکی در بیوتکنولوژی ، پلی پلوییدی، تحقیقات سم شناسی، و روش تعیین جنسیت کروموزومی نیز می توان استفاده نمود.

تهیه گسترش کروموزومی

- تهیه نمونه زنده مطلوب
- استفاده از فیتوهماتوگلوتینی یا کلرید کبالت جهت تحریک تقسیمات سلولی
- استفاده از کلشیسین جهت تهیه کروموزومهای متافازی
- تهیه بافت مورد نظر(خون، باله،....)
- فرایند هیپوتونیزاسیون (استفاده از تری سدیم سیترات، کلرید پتاسیم)
- سانتریفیوژجهت جدا کردن هسته از مواد محلول
- تثبیت با کارنوی
- تهیه گسترش کروموزومی
- رنگ امیزی و نواربندی کروموزومها

تهیه کاریوتیپ

بعد از تهیه گسترش کروموزومی ، از گسترش عکس تهیه می کنیم. تصاویر کروموزومها از عکس تهیه شده بریده شده و بر مبنای کاهش طول کروموزومها و سایر ویژگیهای موزون ، مانند جایگاه سانترومتر مرتب می گردند.

روش های رنگ امیزی کروموزوم

نوارهای گیمسا(G)، فلوروکروم وارن(R)

در جانوران خونگرم محتوی بازها و تراکم نسبی کروماتین در طول کروموزوم دارای تناوبی است که می توان به واسطه رنگ امیزی گیمسا و از روی الگوی نواری حاصل (نوار G) ، کروموزوم را شناسایی نمود. در جانوران خونگرم معمولا تشکیل نوارهای G به واسطه تجزیه توسط تریپسین تسهیل و تحریک می گردد اما عموما این روش در مورد کروموزوم ماهیان کاربرد نداشته است . در پستانداران و پرندگان مناطقی از کروموزوم که پس از رنگ امیزی ، رنگ تیره ای دارند غنی از AT بوده و در اواخر چرخه سلولی مضاعف سازی می شوند، ولی مناطقی که پس از رنگ آمیزی به رنگ روشن دیده می شوند ، مناطق غنی از GC بوده و در اوایل چرخه سلولی مضاعف سازی می شوند. از این رو الگوی نوارG را با استفاده از مواد فلورو کرومی مانند کوئیناکراین یا DAPI (Diamino -2 phenyl- indole4, 6-) که مخصوص رنگ آمیزی DNA غنی از AT می باشند نیز می توان ایجاد نمود(نوارهای Q). الگوی وارون (نوارهای R) با رنگ امیزی به وسیله کروموماپسین (Choromomycin A_3) یا میترومایسین (Mithromycine) ، که DNA غنی از GC را رنگ امیزی می کند، بدست می اید. در جانوران خونسرد DNA غنی از GC زیادی وجود نداشته و نمی توان در کروموزومهای انها نوارهای GC و AT را مشاهده نمود. از این رو معمولا فلوروکروم ها ی مذکور تنها مولکول DNA پر تکرار را رنگ کرده و هیچ گونه الگوی نواری G را ایجاد نمی کنند. در میان ماهیان معدود استثناعاتی نیز به چشم می خورد. به عنوان مثال مارماهی مهاجر ، *Anguila anguila* ، پس از رنگ امیزی با کوئیناکراین الگوی نواری داشته و تریپسین نیز در برخی از ماهیان الگوی نواری G ایجاد کرده است (Gold *et a*l. 1990) .

نوارهای مضاعف سازی

الگوی نواری R (عکس الگوی نواری G در جانوران خونگرم) را می توان در کروموزومهای بیشتر مهره داران با استفاده از روش نوار مضاعف سازی بدست اورد. در این روش سلول ها در حضور ماده متیل ترکسیت (Methyle trexate) کشت داده شده و ماده BrdU (5 bromo – 2 dexoyuridine) نیز در مرحله خاصی از چرخه سلولی افزوده می شود تا در ساختمانن مناطقی که اواخر چرخه سلولی مضاعف سازی می شوندوارد شود. در صورتی که از گیمسا یا اکریدین ارنج (Acridine orange) استفاده شود، مناطق مذکور دارای رنگ امیزی روشنی خواهند بود. از انجایی که عمل مضاعف سازی در طول بیشتر کروموزوم های یوکاریوتی به صورت منقطع انجام می شود، از لحاظ تئوری ایجاد الگوی نواری در کروموزوم ماهیان با استفاده از این روش باید قابل انجام باشد. این روش در چند گونه از کپور ماهیان امریکای شمالی و گونه های نئوتروپیک ، با موفقیت اعمال شده است. علی رغم این در بیشتر گونه های ماهیان استفاده از الگوی نواری برای شناخت هر جز کروموزومی ، کافی نبوده است که احتمالا دلیل ان نیز مربوط به مشکلات هماهنگ نمودن سلول ها و اندازه کوچک بسیاری از کروموزومهای ماهیان می باشد. روش جدیدی که ممکن است الگوی نواربندی دقیق تری را برای شناسایی صحیح کروموزوم ماهیان ایجا کند، روش (Fluorescence In Situ Hybridization). می باشد که در ان پروب هایی برای قطعات تکراری DNA استفاده می شود.

روش ایجاد نوارهای C

هتروکروماتین با استفاده از فنون رنگ امیزی C مشاهده می شود. در این روش بخش های کم تراکم DNA با استفاده از مواد قلیایی مانند هیدروکسید باریم ، تیمار با محلول های نمکی یا با استفاده از هر دو به طور انتخابی از کروموزوم جدا شده و سپس رنگ امیزی گیمسا اعمال می شود. در جوامع طبیعی تنوع درون گونه ای در اندازه و محل قرار گرفتن نوارهای C مشاهده شده و می توان از انها به عنوان نشانگر های جمعیت بهره گرفت. نوارهای C قطعات DNAپر تراکمی می باشند که پشت سر هم قرار گرفته و هر واحد تکراری انها شامل ۱۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز میباشد. بسیاری از ژنوم ها انواعی از این قبیل قطعات را که توالی بازی واحدهای تکراری ان تغییر می کند، دارند. زیر گروه های متعلق به نوارهای C که دارای ترکیب بازی متفاوتی میباشند را می توان با استفاده

از فلوروکروم های مخصوص توالیهای GC و AT شناسایی نمود. ممکن است در اثر تغییرات جزیی مقدار و پراکنش توالی غنی از AT در گونه های خویشاوند نزدیک به هم منجر به مشخص تر شدن رنگ امیزی هتروکروماتین با ماده رنگی کوییناکراین ، در یک گونه شده ولی در گونه دیگر چنین تاثیری نداشته باشد، برای مثال در بیشتر هتروکروماتین های انتهایی (تلومریک) کروموزومهای متاسانتریک قزل الای دریاچه ای ، *Salvelinus namaycush* ، در رنگ امیزی با کوییناکراین نوارهای Q ایجاد می شود، ولی عموما در نقاط مشابه کروموزومهای گونه قزل الای جویباری چنین نوارهایی تشکیل نمی شود . از این رو می توان با توجه به این خاصیت ، منشا والدی بیشتر این کروموزومها را در ماهی دو رگه ، حاصل از امیزش قزل الای جویباری و قزل الای دریاچه ای با استفاده از کوییناکراین تشخیص داد. در حال حاضر شناسایی دقیق و صحیح زیرگروههای نوار C که حاوی واحدهای تکراری با توالی های بازی متفاوت می باشند. با استفاده از روش FISH مقدور می باشد.

رنگ امیزی ناحیه سازماندهی هستکی(NOR)

مناطق سازماندهی هستکی (Nucleolar Organizer Region banding)، به محل قرار گیری ژن های r DNA گفته می شودکه در برخی از این نواحی در طول چرخه سلولی فعالانه نسخه برداری (Transcribe) می شوند. اغلب مواقع این مناطق غیر متراکم بوده و ممکن است به صورت فروفتگیهای ثانویه یا خلا کروموزومی (Gaps in choromosome) ، بویژه در مواقعی که در مناطق درون کروموزوم قرار داشته باشند، دیده شوند. مناطق NOR فعال را می توان با استفاده از رنگ امیری نقره که پروتیین های ریبوزومی را رنگ می کند، مشاهده مود. در ماهیان r DNA غنی از توال هایGC بوده و مناطق NOR فعال و غیرفعال را می وان در بسیاری از گونه ها با استفاده از مواد رنگی کرومایسین A_3 (CMA_3) و میترومایسین مشاهده نمود. اخیرا روش جدیدی (denaturation –prodium iodide staining) برای رنگ امیزی مناطق NOR ماهیان پیشنهاد شده است که در ان از خصوصیات حرارتی r DNA استفاده می شود. نوارهایی که در این روش ایجاد می شوند دقیقا همان وارهایی هستند که در رنگ امیزی با (CMA_3) بدست می اید. به هر حال همانند (CMA_3) در این روش نیز علاوه بر مناطق NOR هتروکروماتین غنی از

GC نیز رنگ آمیزی میشود. از این رو به منظور شناسایی اشکار مناطق NOR، اعمال روش FISH با کمک پروبهای اختصاصی DNA ریبوزومی ضروری میباشد.

رنگ امیزی انزیم های محدود کننده

انزیم های محدود کننده مولکول DNA را در نقاط خاصی شکسته و تجزیه می کنند ، برای مثال انزیم Alu I، مولکول DNA را در محل توالی AG↓CT می شکند. هنگامی که کروموزومها در معرض انزیم محدود کننده خاصی قرار گیرند. در صورتی که مونومرهای تکراری دارای توالی هدف ان انزیم باشند، انزیم ، DNA های تکراری (نوارهای C) را که پشت سر هم تکرار می شوند، تجزیه شد، نوارهای C در محل شکستگی در مقایسه با DNA تکراری فاقد توالی حذف انزیم به رنگ روشن تری مشاهده خواهند شد. از این رو برای شناسایی زیرواحدهای مختلف کروماتین (نوارهایC)می توان از انزیم های محدود کننده مختلفی استفاده نمود. با وجود اینکه باید در تمامی نوارهای c دست کم یک توالی محدود کننده وجود داشته باشد، ممکن است نوارهای C دارای توال هدف مشابه ، توالی های کاملا متفاوتی داشته باشند. روش مستقیم تری برای طبقه بندی قطعات DNA تکراری، تجزیه DNA ژنوم توسط تعدادی انزیم محدود کننده و شناسایی انزیم هایی می باشد که تعداد فراوانی مونومر ایجاد می کنند(نوارهای مجزای روی ژل) . سپس مونومرهای مذکور را می توان کلون نموده و توالی یابی کرد. کلون های نشخص شده را می توان نشاندار کرده و به عنوان پروب هایی جهت شناسایی محل قرار گیری تکرارها در روش FISH به کار برد.

روش FISH

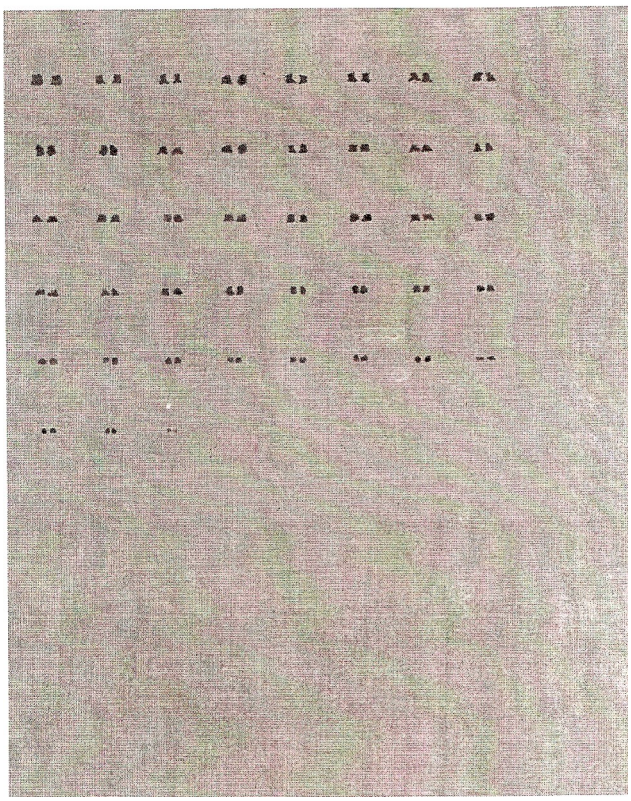
با استفاده از روش FISH می توان محل توالی های DNAFISH مشتمل بر واسرشت کردن قطعات DNA پروب و کروموزومها ، وصل نمودن قطعات DNA پروب به DNA کروموزومی ، شست و شوهای پس از اتصال قطعات و شناسایی و مشاهده نشان ها می باشد.

از این روش در ژنتیک انسانی بهره برداری های متنوعی شده است که می توان از آن جمله به شناسایی کروموزوم های خاص، شناسایی برخی ناهنجاریهای کروموزومی و تعیین محل و نقشه ژن ها بر روی کروموزوم ها ،

اشاره نمود. با استفاده از قطعات DNA پروب مناسب می توان مناطق خاصی از کروموزوم ، کل کروموزومها یا ژنوم های یک گونه را در افراد دو رگه یبین گونه ای رتگ امیزی نمود. پروب های رنگی ویژه کروموزومها ی خاص به واسطه دسته بندی کروموزومها از طریق فلوسورتینگ(Flow sorting : جداسازی کروموزومها به وسیله فلوسیتومتری) یا بوسیله ریز تجزیه (Micro dissection) و به دنبال ان تکثیر DNA با استفاده از اغازگر های چند گانه (degenerate) به روش PCR تولید می شوند. علی رغم انکه مشاهده توالی تکراری DNA ساده تر می باشد، روش جدید PRINS(Primed in situ hybridization) و استفاده از کلون های بزرگی مانند کازمیدها، کروموزومهای مصنوعی مخمر و باکتری به عنوان پروب امکان مشاهده توالی های یک نسخه موجود در کروموزوم های پستانداران را فراهم اورده است. اخیزا کاربرد روش FISH در ژنتیک ماهیان بازنگری شده است (Phillips and Reed, 1996) . جایگاه قطعات DNA (پر تکرار یا دارای تکرار متوسط) مختلفی در محل سانترومر، تله کروموزوم های چندین گونه از ماهیان تعیین شده است. پروب های رنگی به واسطه ریز تجزیه و تکثیر متعاقب قطعات به روشPCR تولید شده است. ژن های تک نسخه در برخی از کروموزومهای ماهیان از قبیل زبرا، Danio rerio، با استفاده از کلون های الحاقی بزرگی مکان یابی شده است. (هارلمن،۱۳۸۴)

در بین روشهای گوناگون مطالعه کروموزومی سخت پوستان ، استفاده از روش تزریق و بافت بیضه (Hayashi and Fujiwara, 1988) در بالغین بهترین روش در میگو ها می باشد. بافتهای آبشش، هپاتوپانکراس وتخمدان گسترش کروموزومی مناسبی را ایجاد نمی کنند، بافت چربی هپاتوپانکراس و زرده موجود در تخمدان به ویژه در مراحل پیشرفته رسیدگی جنسی مانع از تهیه گسترش سلولی و کروموزومی مناسب می شوند. از مراحل لاروی نیز به دلیل داشتن پوسته کیتینی ، گسترش های کروموزومی مناسبی به دست نمی آید. در مطالعه سیتوژنتیک میگوی ایندیکوس تزریق کلشی سین به میزان ۲ میکروگرم به ازای هر گرم وزن بدن ، در جنس نر به صورت داخل عضلانی (IM) صورت گرفته و پس از گذشت زمان ۶-۴ ساعت ، خارج کردن بافت بیضه و بریدن ان به قطعات کوچکتر و استفاده از محلول هیپوتونیک سیترات سدیم ۰/۹ درصد به مدت ۳۰ دقیقه و استفاده از محلول تثبیت کننده کارنوی بهترین نتیجه را داشته است و در بررسی های میکروسکوپیکی، تعداد دیپلویید نمایی کروموزومهای میگوی سفید هندی ۸۶ و تعداد هاپلویید نمایی آن ۴۳ عدد به دست آمد (منصوری، ۱۳۸۶) ، همچنین بررسی مطالعات صورت گرفته در گونه های مختلف میگوی پنئیده تعداد دیپلویید نمایی را بین ۸۶ تا

۹۲ کروموزوم نشان داد که عمده مطالعات با کمک بافتهای بیضه و هپاتوپانکراس انجام گرفته است(جدول۸). اکثر کروموزومها در میگوی پنئیده از نوع متاسنتریک، ساب متا سنتریک و ساب تلو سانتریک می باشد (Dai et al., 1989) . شبهاتی درمورد تغییر تعداد کروموزومی در اثر پدیده پلی پلوئیدیزاسیون در دکاپودها وجود دارد(Hedgecock *et al.*, 1982). تا کنون کروموزوم جنسی درخانواده پنئیده گزارش نشده است (Hayashi and Fujiwara, 1988; Dai *et al.*, 1989).



تصویر ۱-۳ کاریوتیپ میگوی سفید هندی *Penaeus indicus*

جدول۸. مطالعات کاریولوزیکی انجام شده در گونه های مختلف میگوها ی peneidae

منبع	گونه	بافت مورد مطالعه	تعداد کروموزوم	نوع کروموزوم
Niyama *et al*., 1948	*Penaeus japonicus*	هپاتوپانکراس	2n=92	-
Milligan *et al*., 1976	*P.aztecus*	هپاتوپانکراس	2n=88	-
	p. duorarum		2n=88	
	p.setiferus		2n=90	
Mayorga *et al*. 1982	*p. vannamei*	بیضه	2n=92	۷ جفت متا سانتریک،۳۹ جفت اکروسانتریک
	p. stylirostris		2n=92	
	p.occidentalis		2n=92	
	p.californeiensis		2n=92	
Goswami *et al*., 1985	*P.aztecus*	لاروی		۹ جفت متاسانتریک، ۹ جفت ساب متاسانتریک و ۲۶ جفت تلوسانتریک
Fujiguara&Hayashi,1988	*Penaeus japonicus*		2n=86	-
Xiang, 1988	*Penaeus orientalis*	بافت غده انتنی		
Nayak *et al*, 1989	*Penaeus indicus*		2n=88	۸کروموزوم متاسانتریک، ۸۰ کروموزوم اکروسانتریک
	Penaeus japonicus		2n=88	
Chow *et al*., 1990	*p. vannamei*		2n=88	
	P.aztecus	-	2n=88	۴۰جفت متا یا ساب متاسانتریک،۴ جفت اکروسانتریک
	p.setiferus	-	2n=90	۳۹جفت متا یا ساب متاسانتریک،۶ جفت اکروسانتریک
Xianojum Zhang, 1995	*p. stylirostris*		2n=88	
	p.monodon		2n=88	
	p. semisulcatus		2n=90	
	p. chinensis		2n=88	
	p. japonicus		2n=86	
	p. merguensis		2n=88	
Campus-Ramos, 1997	*p.californeiensis*		2n=88	۴ کروموزوم متاسانتریک، ۱۰ ساب متاسانتریک و ۵۶ ساب تلوسانتریک و ۱۸ کروموزوم اکروسانتریک
Jamjum Petsiri, 1997	*p. merguensis*		2n=88	۱۰جفت متا سانتریک و ساب متا سانتریک ،۳۴ جفت تلو و اکروسانتریک
Morelli *et al*, 1998	*Penaeus indicus*		2n=88	
منصوری و همکاران (۱۳۸۶)	*p. semisulcatus*	بیضه	2n=88	۲۱جفت کروموزوم متا سانتریک و ساب متا سانتریک ،۲۳ جفت تلو و اکروسانتریک

۸-۱- ایمنی شناسی میگو

سیستم ایمنی

آبزیان سخت پوست نظیر میگوها و خرچنگهای آب شور وشیرین مانند ماهیان از نظر اکولوژیکی در مخلوطی از انواع فلور باکتریائی، قارچی و انگلی غوطه ورند. سیستم ایمنی سخت پوستان در برابر عوامل بیماریزا بر سه پایه دفاع با استفاده از موانع فیزیکی و شیمیائی ، دفاع سلولی ودفاع هومورال استوار می‌باشد. موانع فیزیکی وشیمیائی شامل کوتیکول (Shell) بوده و زیر آن پوست قرار دارد که هر دونیز دارای ترشحاتی میباشند. اما این دو سد در مقابل ورود عوامل بیماریزا کافی نیستند. بخصوص بدلیل اینکه سخت پوستان دارای سیستم گردش خون باز هستند. در هنگام پوست اندازی به راحتی می توانند مورد تهاجم عوامل بیماریزا قرار گیرند. پس باید دارای یک شبکه ایمنی هم باشند تا بتوانند از خود در مقابل عوامل بیماریزا دفاع نمایند و چون دارای سیستم گردش خون باز هستند عمل انعقاد خون در آنها بسیار مهم است. لذا اگر عمل انعقاد به خوبی اتفاق نیافتد هم خون خود را از دست می دهند و هم عوامل بیماریزا از این طریق وارد خون آنها می شوند. خون در سخت پوستان ،را همولنف وسلولهای خونی راهموسیت گویند. سلولهای خونی شامل هیالوسیتها،گرانولوسیتهاوسمی گرانولوسیتها می‌باشد که هرکدام نقش ویژه‌ای دردفاع دربرابر عوامل بیماریزا را دارند. بعلاوه، سخت پوستان به منظوردفاع دربرابر عوامل بیماریزا ازسیستم دفاع هومورال که مبتنی بر تولید آنزیمهای مختلف می‌باشد نیز برخوردار می‌باشند. سیستم proPO یا پروفنل اکسیداز یک پاسخ دفاعی قوی مادرزادی در مقابل اجرام غیرخودی در بدن می‌باشد. این سیستم با شناسائی لیپوپلی ساکاریدها یا پپتیدوگلیکانها در دیواره باکتریها یا بتاگلوکان ۱ و ۳ در دیواره قارچها در کمتر از چند دقیقه فعال می‌شود. در سخت‌پوستان عمل لخته‌شدن علاوه بر انعقاداز طریق لخته شدن همولنف، از طریق پلیمریزاسیون پروتئینهای انعقادی پلاسما نیز انجام گرفته و این عمل توسط یونهای کلسیم آنزیم ترانس گلوتامیناز که از هموسیتها و سایر بافتها ترشح می‌شود تسریع می‌گردد (افشار نسب،۱۳۸۶).

درک صحیح و شناخت اصولی بیماریها ، منوط به به فهم و دریافت روابط پیچیده میزبان ، محیط و عامل بیماریزا است که بتدریج ، با رشد و تکامل علوم ، این روابط روزبروز روشن تر می شود. اگر بنا باشد بیماری را در یک جمله تعریف کنیم ،می گوییم ((بیماری جلوه ای از تاثیرات متقابل میزبان ، عامل بیماریزا و محیط می باشد.))

شرایط فیزیکوشیمیایی دریاها و اقیانوسها نسبتا ثابت است و معمولا دارای تغییرات فصلی کمی می باشد. درحالی که در دریاچه ها و خلیج های کوچک ، این تغییرات شدیدتر است . از طرفی شرایط داخلی بدن میگوها نسبتا ثابت است و میگوها مجبور به تحمل تغییرات خارجی می باشند. در صورتی که این توانایی جهت سازگاری به حد کافی در میگو وجود نداشته باشد و تغییرات حاصله و استرسها بیش ازحد قوی باشند، بیماری اجتناب ناپذیر خواهد بود. به تعبیر دیگر بیماری نتیجه تاثیر متقابل سیستم فیزیولوژیک میگو و تحریکات زیان اور عوامل محیطی است . عوامل بیماریزا ی زنده ، بیشتر نقش تشدید کننده این نابسامانی را به عهده دارند و نشانه های ایجاد شده در میگوی بیمار ، مربوط به دخالت همین عوامل تشدید کننده است(مجیدی نسب، ۱۳۷۷).

بیماری آبزیان از نقطه نظر عوامل بیماریزا به دو دسته بیماریهای غیرعفونی (ژنتیکی ، تغذیه ای ،....) و عفونی(ویروسی، باکتریایی، قارچی) تقسیم می شوند که می توانند در دورانهای مختلف زندگی آبزیان آنها را تحت تاثیر قرار دهند.

قابل ذکر است در میگوها، به خاطر حساسیت بیشتر پست لاروها و بویژه مراحل لاروی و همچنین تراکم بالای آنها در مخازن ، اکثر بیماریها در این مرحله بروز می کند.

کنترل بیماریها ی میگو و سایر ابزیان ، به سه عامل عمده – پیشگیری ، تشخیص و درمان- بستگی دارد.

اما به دلیل آسانی و ارزان بودن ، پشیگیری رکن اساسی درکنترل بیماریهاست واقدامات اصولی زیررا می طلبد :

الف) افزایش کیفیت آب

ب) کاهش عوامل استرس زا محیطی مثل کمبود اکسیژن ، افزایش دما

ج) تغذبه مناسب

د) استفاده از گونه های مقاوم میگو جهت تکثیر

و) استفاده از واکسن جهت مصون سازی میگوها

ه) اعمال مقررات ایمنی در جابجایی و جلوگیری از انتقال میگوهای الوده و عوامل بیماریزا

ی) استفاده از مواد شیمیایی مانندهیپوکلریت سدیم به منظورکاهش تعداد ویبریونهای سطح خارجی بدن سخت پوستان

درجداول ۲-۱ تا ۵-۱ خلاصه ای از مهمترین بیماریهای ویروسی ، باکتریایی ، قارچی و انگلی گزارش شده از میگوهای پنائیده آمده است.

جدول ۲-۱ خلاصه ای از میزبانهای شناخته شده ، اندامهای تحت تاثیرو ریخت شناسی ویروسهای آلوده‌کننده میگوهای پنائیده(مجیدی نسب، ۱۳۷۷).

نام علمی	نوع ویروس	گونه میزبان	مرحله حساس	بافت هدف	شکل و نوع گنجیدگی تولید شده درون سلولی
Baculovirus Penaei (BP)	باکولو ویروس تیپ A	F.P. duorarum F.P. aztecus l.p.setiferus l.p. vannamei l.p.stylirostris p.monodon	تمام مراحل زندگی تمام مراحل زندگی تمام مراحل زندگی لاروی پست لاروی پست لاروی	HP HP, AMG HP, AMG HP, AMG HP, AMG HP	هرمی شکل(یک یا چند عددی)، ائوزینوفیلیک و داخل هسته ای
Monodon Baculovirus (MBV)	باکولو ویروس تیپ A	p.monodon F.p. merguensis	تمام مراحل زندگی تمام مراحل زندگی	HP, AMG HP, AMG	گرد (یک یا چند عددی)، داخل هسته ای و ائوزینوفیلیک ندارد.
Baculoviral Midgut, Gland, Necrosis (BMNV)	باکولو ویروس تیپ C	*F.p. merguensis*	لاروی وپست لاروی	HP, AMG	منفرد، ائوزینوفیلیک و داخل هسته ای و سیتوپلاسم سلولی بازوفیلیک
Infectious Hypodermal&Hematopoietic Necrosis Virous (IHHNV)	پارو ویروس	*L.p.stylirostris* *p.monodon*	پست لاروی جوانی	HE, CH HEO,CT	
Hepatopancreatic Parvo- like Virus (HPV)	شبه پارو ویروس	*F. merguensis* *p.monodon* *p.semisulcatus* *P. orientalis* *p. scelentous*	جوانی و بالغین جوانی و بالغین جوانی و بالغین جوانی و بالغین جوانی و بالغین	HP HP HP HP HP	بازوفیلیک، فولگن مثبت و داخل هسته ای
White spot syndrome virous(WSSV)	باکولو ویروس (طبقه بندی نشده)	*p.monodon* *P. orientalis* *F.p. indicus* *F.p. merguensis* *p.semisulcatus*	جوانی و بالغین جوانی و بالغین جوانی و بالغین جوانی و بالغین جوانی و بالغین	اکتودرم و مزودرم ابشش	گنجیدگی های سفید رنگ داخل کوتیکول (بیانگر تجمع غیرعادی نمکهای کلسیم)
Reo –Like Virus (REO)	رئو ویروس	*F.p. merguensis* *F.p. merguensis*	جوانی جوانی	HP, AMG HP, AMG	داخل سیتوپلاسمی
Yellow-Head Virus(YHV)	کرونا ویروس	*همه گونه های میگو به خصوص p.monodon*		HP	
Taura Syndrom Virus(TSV)		*همه گونه های میگو به خصوص l.p.vannamei*			

اپیتلیوم هپاتوپانکراس=HP ، اپیتلیوم روده قدامی=AMG، لایه زیرجلدی=CH، سلول خونی=HE، اندام خونساز(هپاتوپانکراس)=HEO، بافت هم بند= CT، Midgut Gland = هپاتوپانکراس

LP=Lito penaeus ،FP=Fennero penaeus ،FAP=Farfante penaeus

جدول ۳-۱ خلاصه ای از میزبانهای شناخته شده ، مراحل حساس ، روش تشخیص باکتریهای الوده کننده میگوهای پنائیده(مجیدی نسب، ۱۳۷۷).

عامل بیماری	نام بیماری	گونه میزبان	مراحل حساس	روش تشخیص	پیشگیری
V. parahemolyticus V. alginolyticus V. anguillarium	ویبریوزیس (Vibrio Disease)	تمام گونه های penaeidae	لاروی، پست لاروی، جوانی و بلوغ	رنگدانه کروماتوفور قرمز رنگ در پاهای حرکتی و کروماتوفور سیاه رنگ در سطح شکمی ، خم شدن قطعه پشتی در قطعه سوم	واکسیناسیون ، بهبود کیفیت اب ، به حداقل رساندن فاکتورهای استرس زا
Vibrio harveyi Vibrio splendidus	باکتریهای درخشنده Luminous Bacterial Disease	*p.indicus* *p.merguensis* *p. monodon*	تخم ، لارو، پست لارو	سفید و کدر شدن لاروها ، لاروهای شدیدا الوده یک پرتو مداوم سبز رنگ نشان می دهند.	بهبود کیفیت اب، کاهش تراکم ف تغذیه مناسب
باکتریهای تولید کننده لیپاز، پروتئاز، کیتینازخارج سلولی- متعلق به جنسهای ویبریو، آئرومونا‌س، پزودوموناس،...	لکه قهوه‌ای(سیاه) پوست Bacterial Shell Disease(Black or Brain Spot)	*p.indicus* *p.merguensis* *p. monodon*	لاروی، پست لاروی، جوانی و بلوغ	خراشهای قهوه ای روی کاراپاس ، تاولهای اب رنگ روی کاراپاس	بهبود کیفیت اب
باکتری رشته ای Leucothrix mucor	بیماری باکتریایی رشته ای Filamentous Bacterial Disease	*تمام گونه های* *penaeidae* *p.indicus* *p.merguensis* *p. monodon*	تخم،لاروی، پست لاروی، جوانی و بلوغ	مشکلات تنفسی ، تغذیه ای و حرکتی همراه با الودگی انگلی و قارچی	بهبود کیفیت اب

جدول ٤-۱ خلاصه ای از میزبانهای شناخته شده ، مراحل حساس ، روش تشخیص قارچهای الوده کننده میگوهای پنائیده

عامل بیماری	نام بیماری	گونه میزبان	مراحل حساس	روش تشخیص	پیشگیری
l. callinectes lagenidium sp. sirolpidium sp. Haliphthoros philippinensis Haliphthoros sp.	لاژنیدیوم یا مایکوز لاروی Larval Mycosis or Lagenidium Disease	تمام گونه های penaeidae	تخم ، لاروی، مراحل اولیه پست لاروی	تخم ها ، لاروها و پست لاروهای الوده سفید می شوند.	بهبود شرایط بهداشتی، پرورشی و بهبود کیفیت اب، ضد عفونی تخمها و کاهش تراکم
Fusarium solani	مایکوز میگوهای جوان و بالغ یا بیماری ابشش سیاه	تمام گونه های penaeidae	جوانی و بلوغ	ضایعات و گرانولوز بافتها	بهبود شرایط بهداشتی
Microsporia	میکروسپوریدیزیس	*p.indicus* *p.merguensis* *p. monodon*	جوانی و بلوغ	ارگانها و بافتهای مبتلا سفید می شوند	ضدعفونی و بهبود شرایط بهداشتی،
Vorticella sp. Epistylis sp.	الودگی تک یاخته ای	*p.indicus* *p.merguensis* *p. monodon*	تخم،لاروی، پست لاروی، جوانی و بلوغ	لایه های رشته رشته روی پوسته و ابششهای میگوهای جوان و با لغ	بهبود کیفیت اب
گرگارین	گرگارین	*p. monodon*	لاروی، پست لاروی، جوانی و بلوغ	میکروسکوپی	از بین بردن میزبان واسط (نرم تنان)

جدول ۵-۱ خلاصه ای از میزبانهای شناخته شده ، مراحل حساس ، روش تشخیص انگلهای الوده کننده میگوهای پنائیده (مجیدی نسب، ۱۳۷۷).

عامل بیماری			گونه میزبان	تشخیص	مرحله حساس	پیشگیری
تک یاخته	Fouling Protozoa	Anophrys Zootgaminilia	تمام گونه های *penaeidae*			بهبود کیفیت اب
	بیماریزا	Microsporidae	*p.indicus* *p.merguensis* *p. monodon*	حالت سفید پنبه ای	جوانی و بلوغ	بهبود کیفیت اب
		Haplosporidae	تمام گونه های *penaeidae*			بهبود کیفیت اب
		Gergarian	*p. monodon*	میکروسکوپی	لارو ، پست لارو ،جوانی و بلوغ	بهبود کیفیت اب و از بین بردن میزبان واسط (نرم تنان)
متازوآ	نماتودها سستودها (میزبان واسط هستند و ار نظر بیماریزایی اهمیت چندانی ندارند.)		تمام گونه های *penaeidae*			بهبود کیفیت اب

تولید میگوی Specific Patthogen Free and Specific Pathogen Resistance (SPF/SPR)

همانطوریکه می دانیم تقریبا بیشترمیگوهای تولیدی در جهان یا از تخم های جمع آوری شده از طبیعت یا از مولدین صید شده ازدریا به دست می آید و این خطر وجود دارد که این میگوها حامل عوامل پاتوژن بوده بدون اینکه علایم بیماری را نشان دهند. درتامین میگو مولد از مزارع پرورشی (culture stock) نیز به جهت محدود و بسته بودن محیط ، خطر ابتلا به بیماری وجود دارد. در سالهای اخیر بیماریهای میگو روی صنعت پرورش میگو در بسیاری از نقاط جهان حتی ایران (بیماری لکه سفید،...) تاثیرات بسیاری داشته است. بنابراین رعایت اصول بهداشتی و پیشگیری از بیماریها ضروری است. یکی از روشهای پیشگیری استفاده از میگوهای عاری از بیماری (SPF) و یا میگوها ی مقاوم به بیماری (SPR) می باشد که می تواند نسل SPF یا SPR تولید نمایند.

مفهوم واقعی میگوی SPF به معنی عاری بودن از هر گونه پاتوژن یا میکروارگانیسم اختصاصی است که موجب مرگ و میر و تلفات در میگوها می شود. این وضعیت میگوها بسته به سطوح ایمنی زیستی و محیط جغرافیایی و گونه میگو متفاوت است. پاتوژنهایی که در لیست اختصاصی میگوهای SPF قرار می گیرند اولا باید با اطمینان قابل تشخیص باشند ، ثانیا بتوان بصورت فیزیکی انها را ازسیستم تکثیر و پرورش جدا نموده و ثالثا بطور مشخص باعث تهدید و آسیب به صنعت تکثیر و پرورش شوند.

ویژگی SPF بودن میگوها ، مادر زادی منتقل نشده و ارثی نمی باشند.

میگوی SPF تولیدی برای دو سال تحت مراقبت بوده و برای کلیه بیماریها ی خاص غربالگری می شوند .اگرمیگوها به مراکز با سلامتی بالا منتقل شود از حالتSPF خارج شده و به آنها High health shrimp می گویند، بنابراین لازم است میگوهایSPF را در شرایط SPF نگهداری کرد.

اصولا در تولید میگوی SPF دو موضوع اساسی باید مد نظر قرار گرفته تا از نظر اقتصادی مورد قبول باشند :

میگوی SPF عاری از پاتوژنها ی اختصاصی باشد.

از نظر اصلاح نژاد میگوهایی انتخاب شوند که ویژگیهای اقتصادی مثل رشد مناسب، بقا مناسب و وزن مناسب را داشته باشند (افشار نسب، ۱۳۸۶).

مهمترین بیماریهای مورد توجه در تولید SPF

همانگونه که بیان گردید بسته به محیط و سطوح ایمنی و نوع میگو ، تعداد پاتوژنها یی که باید در تولید SPF مورد توجه قرار گیرند متفاوت بوده ، بطوریکه برای تولید میگوی SPF وانامی ۹ ویروس مورد توجه بوده ولی برای تولید SPF مونودون ۷ ویروس مورد توجه بوده و بیماریهای BP و BMN که از ویروسهای باکولوویروس بوده و در میگوهای مونودون گزارش نشده است در لیست قرار نمیگیرد. از پاتوژنهایی که به عنوان بیماری و عامل مرگ و میردر میگوی وانامی که مهمترین گونه تولیدی SPF میباشد شامل ۹ ویروس ، یک باکتری و سه پروتوزوا می باشند که در جدول ۲ اسامی آنها ارائه گردیده است. لازم به ذکر است که در این جدول در طی زمانهای مختلف تغییرات فراوانی نموده است، به طوریکه تا قبل از ۱۹۹۲ بیماری WSD دراین لیست نبوده و بعدا به این لیست اضافه شده است، یا در سال ۲۰۰۲ بیماری مجددا به لیست اضافه و امروزه این لیست شامل ۹ ویروس می باشد و جه بسا با با شناخت پاتوژنها مجددا این لیست تغییر نماید .

این پاتوژنها نیز خود به سه دسته یا Category تقسیم می شوند:

C-1 (دسته اول) : پاتوژنهایی که مستنی بوده و توانایی ایجاد مرگ و میر شدید در یگ گونه یا تعداد زیادی از گونه ها ی میگو را دارند.

C-2 (دسته دوم) : پاتوژنهایی که خیلی خطرناک بوده و میتوانند موجب تخریب شوند.

C-3 (دسته سوم) : پاتوژنهایی که پاتوژنهایی که حداقل اثرات را دارند ولی باید از مزارع یا مرکز تولید مولد دور بمانند(افشار نسب، ۱۳۸۶).

جدول٦-١ : لیست مهمترین پاتوژنهایی که از میگوهای پنییده امریکا و اسیا USMSFC اقتباس از(lightner, 2003)

ردیف	نام بیماری	عامل بیماری	دسته پاتوژنها
۱	White spot syndrome virous(WSSV)	Nimaviridae	C1
۲	Taura Syndrom Virus(TSV)	Dicistroviridae	C1
۳	Yellow-Head/Gill Associated Virus(YHV/ GAV)	Roniviridae	C1-2
۴	Infection Myonecrosis virus(IMNV)		C1-2
۵	Hepatopancreatic Parvo- like Virus (HPV)	Enteric parvovirs	C1-2
۶	Infectious Hypodermal&Hematopoietic Necrosis Virous (IHHNV)	A systematic parvovirus	C2
۷	Baculovirus Penaei (BP)	ویروس	C2
۸	Baculoviral Midgut, Gland, Necrosis (BMNV)	A non-occluded enteric baculo-like virus	C2
۹	Monodon Baculovirus (MBV)	A occluded enteric baculo virus	C2
۱۰	Necrotizing Hepatopancratis(NHP)	Prokaryotes, An alpha-protobacteria	C2
۱۱	Microsporidia	انگل	C2
۱۲	Haplosporidia	انگل	C2
۱۳	Gregarines		C3

روشهای تولید میگوهای عاری از بیماری SPF

بعد از مشاهده وضعیت ظاهری،بافت شناسی میگو انجام می گیرد وبدین منظور نمونه برداری از ۱۰ –۲۰ نمونه میگو صورت می گیرد ، در صورت منفی بودن ازمایش نمونه ها به قرنطینه هدایت می شوند و مدت ۳۰ تا ۶۰ روز در قرنطینه نگهداری می شوند، برای این مرحله از پست لارواستفاده می شود که دستکاری ، حمل و نقل و نگهداری ان در قرنطینه راحت تراست و از طرفی پست لاروها علائم بیماری را بهتر از بالغین و جوانیل نشان می دهند (Lotz, 1992) . اگر نمونه ها در قرنطینه علائم بیماری را نشان ندادند، ارزیابی زیستی برای شناخت بیماری انجام می گیرد ، بدین منظور یک گونه میگوی دیگرمشکوک به بیماری وارد محیط می گردد، اگر بعد از ۹ تا ۳۰ روز علائم بیماری بیماری مشاهده نشد . میگوها با در نظر گرفتن پاره ای از ملاحظات و شرایط به عنوان SPF شناخته می شوند(Wyban, 1992).

امروزه از روشهایی همچون پروبها (dot-blot hybridization) و نشانگرهای ژنتیکی (تست PCR) برای شناسایی میگوهای SPF استفاده می گردد. اگرموجود عامل بیماری را نشان دهد در همانجا معدوم می گردد وگرنه به مرکز قرنطینه دوم جایی که عرضه کننده مولدین نسل F_1 هستند معرفی می شوند. با توجه به اینکه بعضی از پاتوژنها از نسل F_1 به F_2 منتقل می شوند ، همچنین بعضی از ویروسها خود را در سنین بالا نشان می دهند و باید جهت غربالگری انها تا زمان رسیدن به سن بالا (حدود ۵ گرم) صبر کرد و بعد ازمایش غربالگری را انجام داد و آنها را در معرض استرس قرار داده تا اگر عفونتی دارند خود را نشان دهند(Lightner,1991).

روشهای تولید میگوهای مقاوم به بیماری SPR

میگوی مقاوم به پاتوژنها نیزبه روشها ی مختلفی تولید می شود . یک راه انتخاب مولدینی است که بطور طبیعی و یا مصنوعی در معرض بیماری قرار گرفتند اما از بین نرفتند این مولدین را مشابه مولدین SPF در چند مرحله نسبت به پاتوژن مورد نظر غربال می کنند . یک راه دیگر این است که با دستکاری در ساختمان ژنوم ویروس پاتوژن مورد نظر را از نظر ژنتیکی غیر فعال می کنند و با و جود عامل ویروس همراه نه تنها بیماری بروز نمی کند بلکه میگو نسبت به بیماری مقاومت نشان می دهد. روش دیگر دادن ترکیبات خاص در خوراک میگو است که با تحریک سیستم ایمنی و افزایش ایمنی ، میگو در برابر بیماریها بطورعمومی مقاوم می شود.

مطالعات انجام گرفته در زمینه میگوهای SPF

تولید میگوهای SPFبرای اولین بار در سال ۱۹۸۹ توسط (USMSFP[2]) در امریکا اغاز گردید و بعد از ان برنامه امیزش گزینشی (به جهت موفقیت امیز بودن امیزش گزینشی در افزایش تولید گوشت سایر دامها ، پرورش دهندگان میگو نیز به سوی امیزش گزینشی و اهلی کردن روی اوردند.) برای ایجاد گونه های SPF با کیفیت بالا با اهداف نگهداری ذخایرمیگوهای عاری از بیماری(SPF) ، جلوگیری از درون آمیزی و بهبود رشد و بقا میگوها اغاز گردید. در حال حاضرامریکا دارای این تکنولوژی می باشد و برخی ازکشورهای اسیایی نیز در صدد دست یابی به ان می باشند . ایران تجربه پرورش گونه SPF وانمی (*Lito penaeus vannamei*) را دارد.

[2] . U.S. Marine Shrimp Farming Program

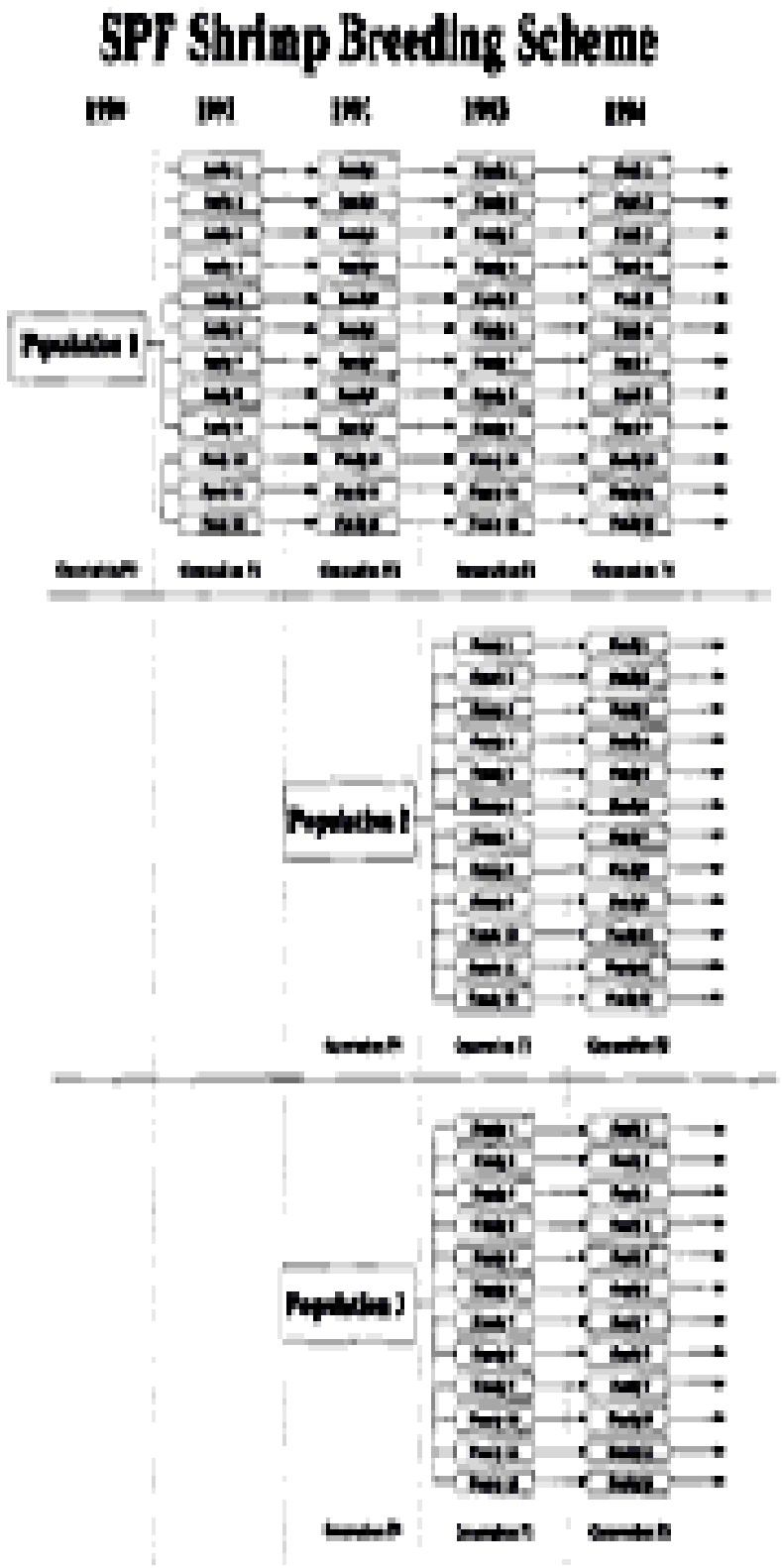
Carpenter و Brock (۱۹۹۲) در مقایسه نرخ رشد و بقایای میگوی های SPF و میگوهای با عفونت ویروسی وانامی دردو سیستم پرورشی متراکم و نیمه متراکم ، در هر دو سیستم نرخ رشد و بقایای بیشترو FCR کمتری را در میگوی های SPF نسبت به میگوهای با عفونت ویروسی مشاهده کردند.

Jaenike و همکاران(۱۹۹۳)مشاهده کردند که میگوی های SPF بقای بالاتر ، نرخ رشد بیشتر و FCR کمتر را نشان دادند .

Wyban در سال ۲۰۰۱به تولید میگوی وانامی SPF پرداخت ، نتایج ازمایشات بقای بالاتر ، نرخ رشد بیشتر(تا ۲۰ گرم در ۱۰۰ روز) وتنوع سایزی کمترو یک دست بودن اندازه (۲ تا ۳ کلاسه سایزی) ، مقاوم به تراکم بالا و مرگ ومیر کمتر را نشان دادند . اما در سال ۲۰۰۲ همین ازمایشات در نسل F_1 نرخ رشد کمتر و تنوع سایزی بالاتر(کلاسه های سنی بالاتر)، مرگ و میز بالا مشاهده شد.

Pantoja و همکاران (۲۰۰۵) به منظور توسعه جمعیتهای میگوی چینی *Fenneropenaeus chinensis* ، انها را نسبت به فاکتور وجود و عدم بیماری با استفاده از روشهای مولکولی با کمک PCR مورد مطالعه قرار دادندو بعد از تست غربالگری و عدم مشاهده پاتوژنهای بیماریزا ، نسل F1 حاصله از انها را برای فعالیتهای تکثیر و برنامه های بهگزینی مناسب دانستند.

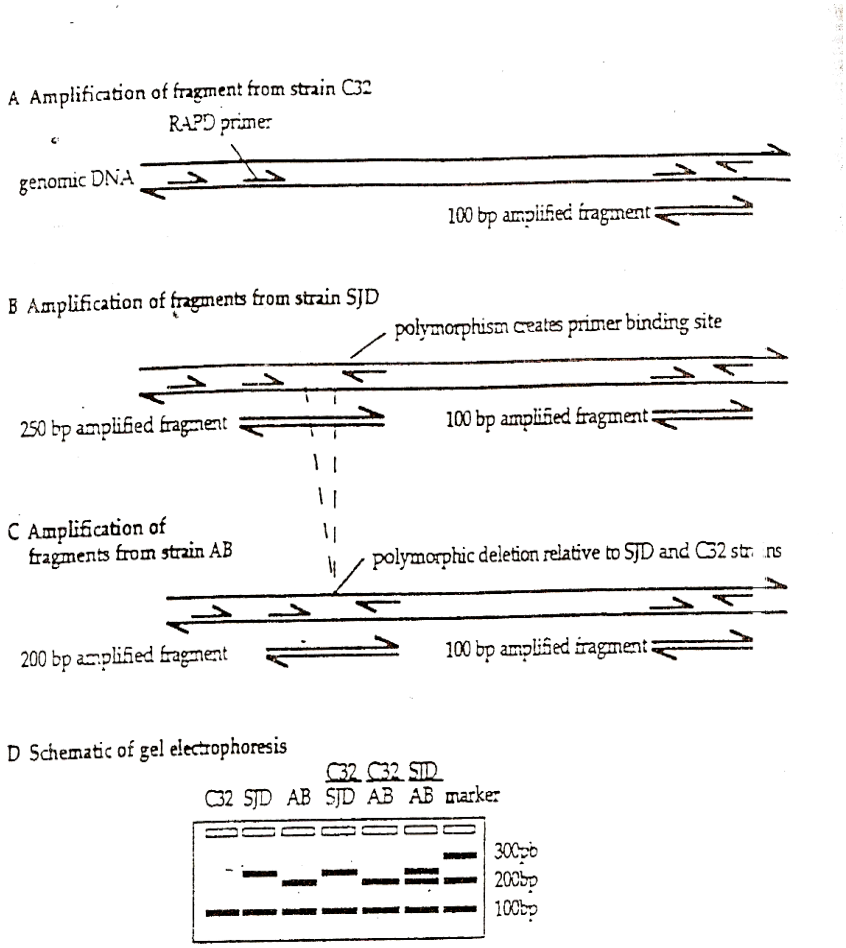
تصویر۳. توسعه ذخایر میگوهای SPF (افشار نسب، ۱۳۸٦)



تصویر ٤- شمای تکثیر میگوهای SPF ، جمعیتهای مستقل از نظر ژنتیکی که به ۱۲ خانواده تقسیم شده اند(Wyban, 1992) .

DNA پلی مورفیک تکثیر شده تصادفیRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

در زمانی کمتر از یکسال دو گروه مستقل،(Williams et al.1990,Welsh and Clelland ,1990) روش جدیدی را برای ارزیابی پلی مورفیسم بر اساس واکنش زنجیره ای پلیمراز در انستیتوی تحقیقاتی بیولوژیک کالیفرنیا ارائه کردند . این تکنیک انگشت نگاری قابل تشخیص ژنوم بدون استفاده از سیستم های رادیو اکتیو و توالی یاب DNA برای ژنوم را فراهم کرد . هر چنداساس این دو تکنیک یکسان بوده است ولیWelsh و همکاران (۱۹۹۰) آنرا AP-PCR (Arbitary Primed DNA) و Williams و همکاران (۱۹۹۰) آنرا Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) نامیدند. روش AP-PCR مشابه با RAPD بود و در هر دو از یک پرایمر استفاده می شود ولی غلظت پرایمر مورد استفاده در آن حدود ۱۰ برابر بیشتر است . پلی مورفیسم مشاهده شده به دلیل تفاوت توالی در یک یا هردو جایگاه اتصال پرایمر است که در صورت حضور یا فقدان یک باند متجلی می شود . (Phillips and Vasil, 2001). اگر یک آغازگر منفرد (معمولا ۱۰ نوکلوتیدی) تصادفی به DNA ژنومی در دو مکان در محدوده یک فاصله قابل تکثیر (کمتر از ۴۰۰ باز قرار بگیرد) در این وضعیت واکنش زنجیره ای پلیمراز می تواند DNA مابین محل اتصال دو اغازگر را تکثیر نماید. از نظر تئوری تعداد قطعات تکثیر شده در این روش بستگی به طول، ترکیب بازی اغازگر و اندازه و پیچیدگی DNA ژنومی دارد. پرایمر های RAPD مختص به ژنوتیپ ، گونه و جنس خاص نیست و قابل استفاده در تمام موجودات می باشد . برای اکثر جانوران اغازگرهای ۹ تا ۱۰ نوکلوتیدی از لحاظ طول با ۵۰-۶۰ درصد GC استفاده می شود که به طور متوسط ۲ تا ۱۰ محصول تکثیر شده تولید می کنند (Foolad et al., 1993) . شکل ۴-۱ نشان می دهد که تکنیک RAPD چگونه به عنوان نشانگرعمل می کند.



تصویر۵. عملکرد نشانگر رپید

شکل (۴-۱) (A) پرایمرهای RAPD بخاطرطول کوتاهشان در مکانهای زیادی در طول یک کروموزوم اتصال پیدا می کنند، ولی تنها قطعاتی تکثیر می شوند که پرایمرها در موقعیت مخالف یکدیگربه روی رشته های DNA مورد هدف متصل شده باشند و به اندازه کافی جهت کپی شدن DNA محصور بین انها ، به هم نزدیک باشند. در اینجا قطعه(bp –۱۰۰) طراحی شده بعنوان شروع کننده تکثیر از سویه C32می باشد که در روی ژل بصورت یک باند در قسمت (D) ، ستون یک نشان داده شده است.

(B) پلی مورفیسم درDNA جایگاههای مشابه در یک سویه متفاوت مثل SJD ، می تواند یک جایگاه اتصال پرایمرجدید ایجاد نماید که اتفاقا در موقعیت و فاصله مناسب جهت تکثیر، یک باند(bp –۲۵۰) ایجاد نماید که

در روی ژل در قسمت (D) ستون دو نشان داده شده است. تغییر دریک جفت باز می تواند یک جایگاه اتصال پرایمری جدید ایجاد نماید.

(C) الحاقات یاحذف شدگی ها ی بین جایگاههای اتصال پرایمر می تواند باندهای پلی مورفیک را در روی ژل ظاهر نماید. در این شکل یک حذف (bp –۵۰) در سویه (AB) نشان داده است که نتایج در باند (bp –۲۰۰) در روی ژل در قسمت (D) ستون سوم دیده می شود.

(D) در این قسمت یک ژل ران شده با هموزیگوتهای AB,C32,SJD درسه ستون اول وهتروزیگوتهای ترکیبی در سه ستون بعدی به صورت شماتیک نشان داده شده است.

الل(bp –۲۵۰)، با توجه به عدم حضور همان قطعه در الل C32غالب می باشد . بخاطر اینکه این باند در PCR با استفاده از این پرایمر با DNAهتروزایگوتC32/SJD دوباره ظاهرشده است. بهمین ترتیب درAB باند (bp – ۲۰۰)با توجه به عدم حضورهمان باند درC32 غالب است. همچنین الل هایAB, SJD در این لوکوس هم بارز هستند بدلیل اینکه باندهای حاصل از دو الل روی ژل در حالت هتروزایگوسیتی متفاوت هستند. البته فقط حدود ۱۰ تا از نسانگرهای RAPD هم بارزهستند(Postleth *et al*., 1999).

تکرار پذیری RAPD و نکات ضروری برای تکرارپذیری آن

یکی از معایب نشانگرRAPD نسبت به RFLP تکرارپذیری پایین این می باشد. ناپایداری نتایج رپید به دلیل استفاده از اغازگرهای کوتاه و دمای پایین اتصال اغازگر ها به DNA الگو (۴۲-۳۶ درجه سانتی گراد) که باعث تکثیر غیر اختصاصی و تصادفی بعضی نقاطی که دارای شباهت کمی با اغازگرها هستند می گردد.

برای اینکه نتایج حاصله از نشانگر رپید تکرارپذیر شوند، بایستی موارد زیر را رعایت کرد.

غلظت DNA ژنومی باید بدقت تعیین شود.

میزان DNA مورد استفاده در واکنش ، یکنواخت و مقدار ان به دقت تعیین شود(۵۰ نانو گرم در هر واکنش)

ارزیابی های RAPD به وضیت حرارتی ثاقعی دستگاه ترموسایکلر حساس است، بنابراین لازم است نتاج حاصل از یک ترموسایکلر با ترموسایکلر دیگر تکرار ، وضعیت حرارتی با یک ترموکوپل اندازه گیری و سپس با یکسان شدن تقریبی وضعیت حرارتی هر دو ماشین تنظیم صورت گیرد.

روشهای تست کردن تکرار پذیریRAPD

تلاش در تهیه نمونه های کاملا مستقل ، مثلا استخراج DNA ۲ یا ۳ دفعه از همان لاین یا رقم و سپس با DNA های استخراج شده در هر دفعه RAPD انجام شود و تکرار پذیری محاسبه شود.

دومین روش در تست تکرار پذیری ، بررسی تفرق مندلی در یک جمعیت در حال تفرق می باشد.

الف) مزایا

در تهیه نقشه های ژنتیکی یک گروه اغازگر تصادفی می تواند برای انالیز ژنوم در تعداد زیادی از گونه ها استفاده شود. در حالیکه درنشانگرPCR استاندارد، اغازگری که در انالیز مثلا ژنوم تیلاپیا، استفاده می شود اختصاصی برای تیلاپیا است.

کارهای مقدماتی همچون جداسازی پروبهای کلون شده در(RFLP) ، تهیه فیلترهایی برای هیبریداسیون و یا توالی سنجی نوکلوتیدهای مور نیازنیست.

نیاز به مقدار کم DNA (۱۰۰-۵۰ نانوگرم حتی کمتر)

عدم به کارگیری مواد رادیواکتیو

اختصاص سرمایه کمتر به امر تجهیزات آزمایشگاهی در مقایسه با سایر روشها

سرعت بالای نشانگرRAPD

عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف DNA جهت طراحی اغازگر

ب) معایب

۱- عدم تکرار پذیری ازمایشات

۲- دشواری امتیازدهی به باندهای ایجادشده بر روی ژل

۳- عدم تشخیص سیستم آللی (به دلیل غالب و مغلوبی بودن RAPD تشخیص هموزیگویتی و هتروزایگوتی غیر ممکن است)

۴- نامعلوم بودن شباهت باندهایی که روی ژل الکتروفورز دارای مهاجرت و اندازه یکسان هستند ولی ممکن است از نظر توالی با همدیگر متفاوت باشند.

۵- حساسیت فوق العاده این نشانگرها به الودگیها

۶- ظهورباندهای غیر اختصاصی وتسلسل قوی باندها (Westneat et al., 1994; Williams et al., 1999

۲- مواد وروشها

۲-۱- نمونه برداری

نمونه برداری از ۹۰ میگوی نسل اول مولدین نر و ماده peneaus indicus که بعد از گذراندن مراحل لاروی به مدت ۴ ماه در استخرهای خاکی پرورش داده شدند ، انجام گرفت. طول و وزن میگوها به ترتیب با دقت (±1mm) و (±0.001gr)اندازه گیری شد و میگوها در سه گروه وزنی کوچک ، متوسط و بزرگ طبقه بندی گردیدند.

مواد و وسایل مورد نیاز : الکل اتانول ۹۶٪ ، تیوپهای ۱/۵ میلی لیتری ، قیچی و برچسب

۲-۲- استخراج DNA کل

روشهای متعددی برای استخراج DNA وجوددارد که در این تحقیق روش فنل-کلروفرم (Hilis&Moritz,1990)

مواد مورد نیاز : فنل متعادل (pH= ۸)، کلروفروم، ایزوآمیل الکل، بافرSTE (۱۰۰ mM Nacl 20 mM ,Tris-Hcl , ۱۰mM EDTA)،ا تانول مطلق ۷۰ درصد ، پروتئیناز K (۲۰ mg/ml) ساخت Cinnagene ، محلول SDS ۲۰درصد (سدیم دود سیل سولفات) ، آب مقطر تزریقی و بافت مورد نظر

تجهیزات مورد استفاده : قیچی ، میکروسانتریفیوژ (ساخت شرکتEppendorf مدل ۵۴۱۴۵) ترمومیکسر (ساخت شرکت Eppendorf مدل ۵۴۱۴۶) تیوپ و رک ، نمونه بردارها و نوکهای مربوط به آنها با توانائی ۱۰۰۰،۱۰۰،۲۰ میکرولیتر ، دستکش یکبار مصرف ، یخچال ۴°

مراحل استخراج

۱ -۵۰ میلی گرم بافت پلیوپود در یک ویال ۱/۵ میلی لیتری استریل قرار داده شد .

۲) ۶۰۰ میکرو لیتر بافرSTE، ۲۰-۳۰ میکرولیتر SDS۲۰ درصد، ۱۰ -۵ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰ mg/ml) به نمونه بافت داخل ویال اضافه گردید و بافت با استفاده از قیچی به صورت قطعات کوچک خرد گردید .

۳ـ فعالیت ایتیمم پروتئیناز K قلیائی و در دمای ^{o}C ۶۰ ـ ۵۰ می باشد بدین منظور ویالها را در ترمومیکسر با دمای ^{o}C ۵۵ و شیکر ۱۰ دور قرار داده تا بافت به طور کامل لیز شده و به صورت امولسیون غلیظ درآمد .

۴-میزان۳۰۰µL فنل ۳۰۰ µL کلروفوم به نمونه اضافه کرده و یک دقیقه شیکر کرده و سپس در دور۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید .

۵- به آرامی فاز بالایی را جدا کرده و در ویال جدیدی ریخته محلول فنل ، کلروفورم و ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۵:۲۴:۱ اضافه گردید دوباره مراحل شیکر، سانتریفیوژ و جداسازی فاز بالایی طبق مراحل بالا انجام شد .

۶- محلول را جدا کرده و به میزان ۵۰۰µL کلروفورم و ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۴:۱ اضافه کرده ، مراحل شیکر ، سانتریفیوژ و جداسازی فاز بالایی تکرار گردید .

۷- محلول روئی را جدا کرده و در این مرحله برای رسوب DNA به اندازه دو برابر حجم محلول داخل ویال الکل اتانول مطلق سرد اضافه شد و به آرامی ویال های سروته شده تا کلاف DNA ظاهر گردد . جهت رسوب دادن DNA و جدا سازی آن از الکل از سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰ به مدت ۷ دقیقه استفاده شد .

۸- فاز بالایی به آرامی تخلیه شده ، مجددا رسوب با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد و به مدت ۷ دقیقه در دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ گردید .

۹- فاز بالایی را تخلیه کرده و به منظور خشک شدن علامت DNA ویال ها به مدت یک ساعت وارونه به روی کاغذ صافی یا دستمال کاغذی قرار داده شد .

۱۰- پس از خشک شدن DNA مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر به DNA اضافه گردید جهت حل شدن به مدت یک ساعت در دمای ^{o}C ۳۷ قرار داده شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت به دمای ^{o}C۴ منتقل گردید تا به طور کامل حل شد پس از آن جهت نگهداری طولانی مدت نمونه ها به فریزر ^{o}C ۲۰- منتقل گردید .

ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش های اسپکتروفتومتری و الکترو فورز استفاده گردید .

ارزیابی کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری

مواد مورد استفاده : DNA استخراج شده

تجهیزات مورد استفاده شدهDNA : دستگاه اسپکتروفتومتری

روش ارزیابی : برای تعیین کمیتDNA نمونه ها پس از کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفتومترCECIL (مدل ۲۰۴۰DE) با آب مقطر ، ۲۰میکرولیتر DNA ژنومی به وسیله آب مقطر به حجم ۳۰۰µL رسانده شد ، مقدار جذب نوری نمونه ها در طول موج ۲۶۰ , ۲۸۰ نانومتر و نسبت A260/280 به وسیله دستگاه اندازه گیری و ثبت گردید .غلظت DNA با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید : $D * A_{260}$ *۵۰ = غلظت DNA بر حسب ng/ml

A : میزان جذب نوری در طول موج ۲۶۰نانومتر

D : نسبت رقت ۶۰ =۳۰۰۰/۲۰

اگر نسبت رقت A1/A2=۱/۸ باشد DNA مناسب است و اگر A1/A2>۱/۸ باشد DNA دارای ناخالصی RNA است واگر نسبت رقت A1/A2< ۱/۸ باشد نشان دهنده ناخالصی با فنل وپروتئین است.

ارزیابی کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز

مواد مورد استفاده : بافر TAE با غلظت ۱۰X (تریس استات) ، آگاروز ، بافرسنگین کننده (Loading buffer) اتیدیوم بروماید ۱٪ ، آب مقطر تزریقی

تجهیزات مورد استفاده: نمونه بردارها و نوکهای مربوطه به آنها با توانایی برداشتن نمونه با حجم ۲۰ میکرولیتر ، سینی ژل و نشانه های آن دستکش یک بار مصرف ،دستگاه UV ترانس ایلیومیناتور ، الکتروفورز افقی و منبع تامین کننده جریان الکتریسته (ساخت شرکت (Amersham Pharmacia) دستگاه مستند سازی ژل (Vilber loumat) همراه با برنامه نرم افزاری Biocapt

روش ارزیابی : در این روش DNA استخراج شده روی ژل آگاروز ۱٪ (برحسب اندازه DNA) الکترو فورز گردید .

۱- تانک الکتروفورز ژل را تمیز و خشک شده و درسطح افقی قرار داده شد .

۲- سینی مخصوص ژل را در محلی مسطح قرار داده و شانه روی ژل قرار داده شده تا یک میلی متر با کفی سینی ژل فاصه داشته باشد دو طرف سینی با استفاده از چسب نواری بسته می شود .

۳- برای تهیه ژل آگارز یک درصد، ۳ میلی لیتر بافر TAE(10 x) را در ارلن ریخته و ۰/۳ گرم آگارز به آن اضافه گردید و حجم آن با آب مقطر به ۳۰ میلی لیتر رسانده شد.

۴- سوسپانسیون حاصله را روی شعله حرارت داده تا آگارز در آن حل وشفاف شود وسپس ارلن دردمای محیط آزمایشگاه قرار می گیرد تا سرد شود .

۵- زمانیکه دمای محلول به حدود ۵۰ درجه سانتی گراد رسید مقدار یک میکرولیتر اتیدویوم بروماید ۱٪ به آن اضافه و محلول کاملاً بهم زده شد .

۶- آگاروز مذاب را در سینی ژل ریخته و اجازه داده تا منعقد گردد .

۷- پس از بستن ژل حائلهای دو طرف سینی را باز و ژل به آرامی داخل تانک الکتروفورز قرار داده شد و پس از مدتی شانه ژل به آرامی از ژل خارج گردید .

۸- ۵ میکرولیتر ازDNA ژنومی همراه با ۳ میکرولیتر با فر سنگین کننده در ۸ میکرولیتر آب مقطر تزریقی کاملاً مخلوط و با دقت به هر یک از چاهکهای ژل ریخته شد.

۹- تانک الکتروفورز به منبع جریان برق متصل و دستگاه مولد برق بر روی ۹۰ ولت و ۴۵ میلی آمپر تنظیم گردید .

۱۰-پس از رسیدن با فر سنگین کننده به انتهای ژل مورد نظر بر روی دستگاه U V ترانس ایلیومینیاتور منتقل گردید و کیفیت DNA از لحاظ خلوص ، آلودگی فنلی ، پروتئینی و شکستگی DNA مورد ارزیابی قرار گرفت و تا حدودی کمیتDNA مورد ارزیابی قرار گرفت.

واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR

مواد مورد استفاده: آنزیم تک DNA پلیمراز ساخت شرکت سیناژن ، $MgCl_2$ ۵۰mM ساخت شرکت سیناژن، PCR Buffer در غلظت ۱۰Xساخت شرکت سیناژن ، آب مقطر تزریقی ، DNA ژنومی استخراج شده. پرایمرهای رپید ساخت شرکت سیناژن و MWG آلمان (جدول ۲-۱)

تجهیزات مورد استفاده: نمونه بردارها ونوکهای مربوط به انها با توانایی برداشتن ۱۰،۱۰۰،۲۰میکرولیتر وتیوپهای ۰/۲ میلی لیتری استریل ، ترموسایکلر ساخت شرکت Eppendorf

جدول۲-۱پرایمرهای مورد استفاده

۵ٰ→۳ٰ	Anneling	نام اغازگر
GGTGGCGGGA	35	OPAQ1
GAGGTCCAGA	39	OPAQ2
GCTGCTGGAG	37	OPAQ3
GCTGTAGTGT	37	OPAQ4
GCGGTTGAGG	35	OPAQ5
CAAGGGAGGT	34	OPAQ6
GGGCACGCGA	35	OPAQ7
ACGGCCGACC	32	OPAQ8
CGGAGAGCGA	51	OPAQ9
TGGGCTCGCT	50	OPAQ10
ACTTGTGCGG	53	OPAQ11
GCGGGAGACC	53	OPAQ12

انجام PCR

۱-برای هر نمونه یک ویال۰/۲ میلی لیتری استریل انتخاب وشماره نمونه روی آن ثبت گردید.سپس روی یخ ترکیبات جدول ۳-۳ با مقادیر مشخص شده افزوده شد.

جدول ۲-۱نوع ومقدار مواد استفاده شده در واکنش زنجیره ای پلیمراز

ماده	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۲۵ میکرولیتری
DNA	۱۰۰ نانوگرم	≤1 µg
انزیم تک DNA پلیمراز	۱u/µ	۰/۲ میکرولیتر
DNTPs	۱۰ میلی مولار	۰/۵ میکرولیتر
M gCl_2	۵۰ میلی مولار	۰/۸میکرولیتر
PCR Buffer	۱۰X	۲/۵میکرولیتر
پرایمر	۳۰/Variableپیکومول	۱ میکرولیتر
اب مقطر	ــــــــــــ	تا ۲۵ میکرولیتر

۲-محتویات ویالها توسط سمپلر خوب به هم زده شدو سپس ویالها را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کرده تا محتویات لوله ها ته نشین گردد.

بهینه کردن PCR

برای بهینه کردنPCR ابتدا PCR استاندارد که شامل مراحل زیر است را انجام داده وسپس با توجه به محصولات PCR اقدام به تغییر شرایط گردید(جدول ۴-۳).در مرحله اول با دادن دامنه حرارتی(۶۴-۵۴)، بهترین دمای اتصال هر کدام از اغازگرها به رشته الگو به دست آمد ودر مرحله بعد جهت تظاهر خوب باندها وحذف شکستگی (اسمیر) غلظت $MgCl_2$ ، DNA ژنومی ، آغازگرو dNTPs بهینه سازی گردید.

جدول ۳- ٤ برنامه های داده شده به دستگاه PCR

مراحل	درجه حرارت(سانتی گراد)	زمان(min)	تعداد چرخه(سیکل)
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۵-۱۰	۱
واسرشته سازی الحاق بسط	۹۴ ۳۲-۵۳ ۷۲	۰/۵ ۰/۵ ۰/۵-۳	۲۰-۳۵
بسط نهایی	۷۲	۳-۱۰	۱

پس از اتمام کار نمونه ها به یخچال منتقل گردید.

الکتروفورز محصول PCR ، با استفاده از آگاروز ۳٪

پس از آماده سازی ژل نمونه‌ها با به ترتیب در محل چاهک‌ها ریخته شده و با روشن نمودن دستگاه و تنظیم مولد برق آن بروی ولتاژ ۷۵ ولت ، الکتروفوز نمونه‌ها در مدت ۱ ساعت انجام شد.

رنگ آمیزی ژل آگاروز ۳٪

ژلهای تهیه شده در حمام اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید.

اثبات مجدد باند پلی مورف اختصاصی

استخراج DNA از بافت میگو

به منظور استخراج DNA از بافت میگو از روش فنول-کلروفورم استفاده شد(Hillis et al., 1996).

واکنش زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction (PCR)

با استفاده از پرایمر OPAQ 4، DNA سه گروه میگو تکثیر شدند.

الکتروفورز ژل آگارز

حدود ۳µl ازمحصولات PCR نمونه های مورد نظر(دارای باند شارپ) با کمی لودینگ بافر مخلوط و با سمپلر مناسب به درون چاهک های ژل آگارز ۲٪ منتقل شدند. سپس درب تانک بسته شده و الکترودهای تانک به منبع تغذیه وصل شدند و الکتروفورزاغاز شد. این اتصال به گونه ای است که DNA به سمت آند مهاجرت خواهد کرد به عبارتی قطب منفی مجاور چاهک ها و قطب مثبت در سمت خلاف چاهک هاست. در این صورتDNA که دارای بار منفی است به سمت قطب مثبت حرکت خواهد کرد. ولتاژمورد نیاز برای این الکتروفورز ۸۰-۱۰۰ ولت است. پس از اتمام زمان الکتروفورز، جریان قطع و درب تانک برداشته شد .به دلیل اینکه درون ژل رنگ اتیدیوم بروماید اضافه نشده بود، ژل از سینی ژل خارج و به مدت حدود 20 دقیقه درون ظرف حاوی اتیدیوم بروماید قرار گرفت. بعد از رنگ گرفتن، ژل به کمک دستگاه transilluminator که از خود نور ماوراءبنفش ساطع میکند مشاهده و سپس عکس آن تهیه شد .

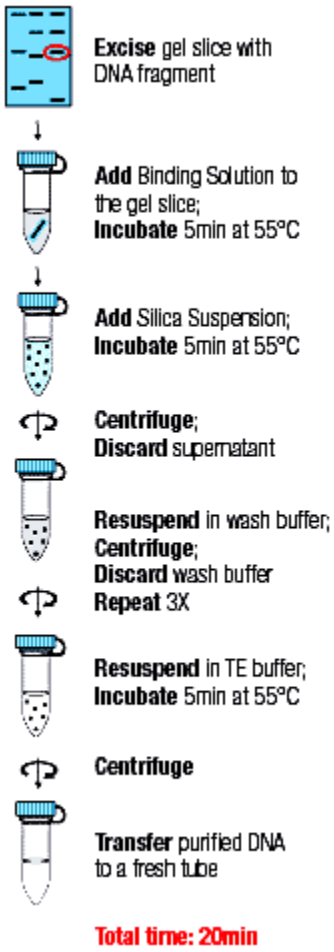
حال می توان از مطلوب بودن واکنشPCR و عدم تشکیل باندهای غیر اختصاصی مطمئن شد در غیراین صورت واکنش باید مجدداً بهینه و تکرار گردد . در صورت نیاز همچنین می توان از روشهای تخلیص محصولات PCRاستفاده کرد .

استخراج باند مورد نظر از ژل با استفاده از کیت تجاریGel Extraction (ساخت شرکت Fermentas)

یکی از راههای تمیز کردن محصول PCR برای تعیین توالی استخراج باند مورد نظر از ژل است که با استفاده از این روش علاوه بر حذف باندهای غیر اختصاصی و نامطلوب می توان پرایمر دایمرها و اسمیرهای ایجاد شده در واکنشPCR را از باند مورد نظر جدا کرد تا نتایج بدست آمده از تعیین توالی از کیفیت مطلوبی برخوردار باشند . برای این منظور در این تحقیق از روش استخراج محصول PCR از ژل آگارز استفاده گردید.

روش کار

مقدار 5-10 µl از محصول بدست آمده بعد از واکنش PCR روی ژل آگارز 2 -1.5% برده شد و الکتروفورز برای آن انجام شد .سپس به مدت کوتاه ژل داخل رنگ اتیدیوم بروماید گذاشته شد. تا حدی که فقط باندهای مورد نظر قابل دیدن با اشعهUV باشند .باید دقت شود که از آنجایی که اتیدیوم بروماید و اشعهUV برای محصولات زیستی مضر بوده و مانع فعالیت آنها می شوند حداقل زمان آنها استفاده شود در مرحله بعدی با استفاده از اشعه UVباند مورد نظر مشاهده شده و از ژل خارج می شود . سپس با استفاده از دستورالعمل موجود ابتدا بافر اتصال کننده (Binding solution) به ژل بریده شده اضافه شد و به مدت پنج دقیقه در دمای 55° C قرار داده شد تا ژل به خوبی در بافر حل شود آنگاه به میزان µl ۵ از سوسپانسیون سیلیکا (Silica suspension) به قبلی اضافه شد و مجددا به مدت پنج دقیقه در دمای °55حرارت داده شد .بعد از سپری شدن زمان لازم تیوب ها به مدت ۱۰ثانیه با دور g× 11000سانتریوفوژ شده و محلول رویی خارج گردید . رسوب بدست آمده در ته تیوب شامل محصول PCR مورد نظر است که به دانه های سیلیکا متصل شده اند در مرحله شستشو از بافر.(Wash buffer) استفاده کرده و بعد از حل کردن رسوب در بافر به وسیله ورتکس کردن رسوب مجددا سانتریوفوژ با همان شرایط مذکور انجام شده و مایع رویی تخلیه شد .برای شستشوی بهینه این عمل سه بار تکرار شد در مرحله آخر میزان µl ۵ آب دیونیزه به رسوب اضافه شد و از آنجا که تمایلDNA ، به آب از هر ماده دیگری بیشتر است DNA در حین تیمار پنج دقیقه ای از سیلیکا جدا شده و در آب حل شد ومی توان بعد از سانتریوفوژ نهایی محلول رویی را به تیوب جدیدی منتقل کرد .این محلول حاوی محصولPCR مورد نظر بدون هیچ گونه ناخالصی است که می تواند مستقیما برای تعیین توالی ارسال شود . شکل زیر مراحل استخراج باند مورد نظر از ژل آگارز را نشان می دهد.



مراحل استخراج باند مورد نظر از ژل آگارز

باند استخراج شده جهت انجام تعیین توالی به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی کوثر فرستاده شد، اما پاسخ موردنظر دریافت نشد از این رو نمونه ها برای کلون به ازمایشگاه ژنتیک دانشگاه شهید بهشتی ارسال شد.

کلونینگ (Cloning)

ژن کلونینگ فرآیندی است که طی آن توالی مشخصی از DNA را جداسازی می‌کنند تا نسخه‌های یکسانی از آن را در محیط طبیعی (سلول یا بافت زنده) بدست آورند.

هدف از ژن کلونینگ فراهم کردن نسخه‌های متعدد از یک ژن منفرد است. تکثیر یک ژن در حوزه‌های مختلف تحقیقاتی مورد استفاده است. به علاوه دارای کاربردهای پزشکی از قبیل ژن درمانی و کاربردهای صنعتی نظیر

تولید مقدار زیادی از یک پروتئین می‌باشد. در کلونینگ ژن برای انتقال ژن مورد نظر به سلول میزبان معمولاً لازم است که آن را وارد یک ناقل یا وکتور DNA ای کنند .

برای آنکه یک مولکول DNA به عنوان وکتور قابل استفاده باشد باید دارای مجموعه‌ای از خصوصیت باشد، شامل :

۱- همانندسازی مستقل از سلول میزبان داشته باشد. به این دلیل که بتواند سریعتر از تقسیم سلولی تکثیر شود تا در نهایت نسخه‌های زیادی از آن تولید شود.

۲- در هنگام تقسیم سلولی به سلول‌های دختری (سلول‌های حاصل از تقسیم) انتقال یابد .

۳- اندازه‌ی کوچک در حدود ۱۰ کیلوباز داشته باشد، چراکه مولکول‌های بزرگتر از این مقدار ممکن است در طی مراحل تخلیص و کلونینگ خرد شود و دستورزی آن نیز مشکل است.

از معدود مولکول‌های DNA ای که این ویژگی‌ها را دارا می‌باشند پلاسمیدها اند.

برای کلون کردن ژن قطعه‌ای از DNA را از موجودی به موجود دیگر منتقل می‌کنند. سلولی را که منشا DNA از آن است را «دهنده» و سلولی را که آن را دریافت می‌کند «میزبان» می‌گویند. کلونینگ ژن به روش‌های مختلفی صورت می‌گیرد اما اساس همه‌ی آنها به این صورت است که DNA هدف از سلول دهنده استخراج می‌شود و با کمک آنزیم‌هایی برش داده می‌شود و به داخل یک مولکول DNA حلقوی، که معمولاً یک پلاسمید است و نقش ناقل (وکتور) را دارد، وارد می‌شود. به این ترتیب یک مولکول DNA نوترکیب ساخته می‌شود. در مرحله‌ی بعد DNA نوترکیب را به سلول میزبان که اغلب نوعی باکتری می‌باشد منتقل می‌کنند. این مرحله را ترنسفورماسیون می‌نامند. DNA نوترکیب در سلول میزبان همانندسازی می‌کند و همراه سلول میزبان تکثیر می‌شود. سلول‌های حاصل از تقسیم سلول میزبان اولیه، نسخه‌هایی از DNA نوترکیب همانندسازی شده را به ارث می‌برند. سلول‌های باکتری به دنبال تقسیمات متعدد کلنی تشکیل می‌دهند و از آنجا که اعضای این کلونی حاوی یک یا چند نسخه از ژن مورد نظر ما که در DNA نوترکیب حمل می‌شود می‌باشد، می‌توان گفت این ژن کلون شده است.

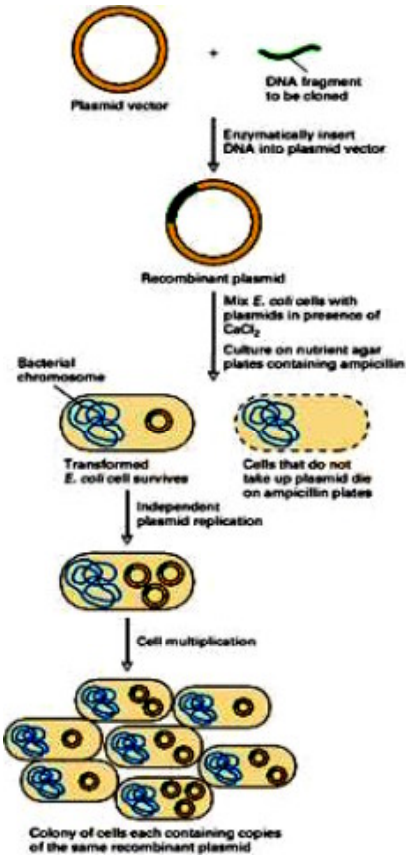
استخراج و برش ـ اولین گام در تولید DNA نوترکیب و سپس کلون کردن آن، استخراج و برش وکتور از سلول باکتری و DNA از سلول دهنده می‌باشد.

برای استخراج DNA از سلول دهنده، ابتدا باید «عصاره‌ی سلولی» تهیه کرد. برای این منظور غشای سلول را متلاشی می‌کنند تا محتویات آن خارج شود سپس مخلوط حاصل را سانتریفیوژ می‌کنند تا زوائد آن ته‌نشین شود و مایع رویی که «عصاره‌ی سلولی» است و حاوی DNA می‌باشد را جمع آوری می‌کنند. عصاره‌ی سلولی علاوه بر DNA حاوی پروتئین و RNA نیز می‌باشد. با یکی از روش‌های «تجزیه‌ی آنزیمی پروتئین و RNA » یا «کروماتوگرافی تعویض یونی» DNA را از عصاره‌ی سلولی تخلیص می‌کنند.

برای استخراج پلاسمید از سلول باکتری، بعد از تخلیص DNA باید پلاسمید را از DNA کرومزوم باکتری جدا کرد.برای این منظور از تکنیک « اولتراسانتریفیوژ » که بر مبنای شیب جرمی می‌باشد استفاده می‌کنند.

بعد از جداسازی، DNA سلول دهنده باید به قطعات کوچکتر بریده شود. برش DNA به قطعات کوچکتر را می‌توان از طرق راه‌های مختلفی انجام داد از آن جمله ایجاد شکست در DNA با استفادها از امواج صوتی (سونیکیت)می‌باشد. در این صورت طول قطعات حاصل از یک مولکول DNA با مولکول دیگر متفاوت خواهد بود چرا که شکست مولکول DNA به صورت تصادفی صورت می‌گیرد. کشف «آنزیم‌های محدود کننده» (restriction enzymes) محققان را قادر ساخت تابتوانند قطعات با طول یکسان را از چندین مولکول DNA یکسان فراهم کنند. آنزیم‌های محدود کننده باکتری‌ها را قادر به دفاع در مقابل فاژها می‌کند. این آنزیم‌ها مولکول DNA را درمحل‌های ویژه‌ای باترتیب نوکلوتیدی خاصی قطع می‌کنند. بنابراین برای آنکه یک مولکول DNA با این آنزیم‌ها بریده شود، وجود توالی‌های خاصی به **نام** «جایگاه محدود کننده» در مولکول DNA ضروری است و باید برای برش DNA به دنبال آنزیمی گشت که دارای بیش از **۲** جایگاه محدود کننده بر روی آن باشد.

مزیت دیگر استفاده از آنزیم‌های محدود کننده این است که می‌توان از همان آنزیم برای برش پلاسمید ناقل استفاده کرد و به این طرق امکان انطباق دو انتهای قطعه‌ی ژن هدف با دو انتهای بریده شده‌ی پلاسمید را به سادگی فراهم کرد.



مراحل کلونینگ

کیت کلونینگ TA برای اینزرت محصول PCR مورد نظربه پلاسمید استفاده شد.

بازیابی قطعه تکثیر شده

DNA نوترکیب با استفاده از کیت QLA از پلاسمید جدا شد.

جداسازی قطعه تکثیر شده از پلاسمید نوترکیب

قطعه تکثیر شده با استفاده از انزیم های *XbaI* و *SacI* از پلاسمید نوترکیب جدا شد.

نمونه ها جهت انجام تعیین توالی به ازمایشگاه ژنتیک پزشکی کوثر فرستاده شد.

تعیین توالی (Sequencing) مستقیم محصولات PCR

تعیین توالی به روش اتومات انجام گرفت بنابراین فقط مختصری در مورد روش تعیین توالی صحبت می شود .

دو روش شیمیایی برای بررسی توالیDNA در دست است . روش خاتمه دیداکسی(ddNTP) که به وسیله Coulson و Nickle، Sanger در سال 1977 میلادی ابداع شد (Pherson *et al.* 2000) و روش شکست شیمیایی (Chemical cleavage) که توسط Gilbert and Maxam (1977) شد .روش دیداکسی متداولترین روش مورد استفاده میباشد . تعیین توالی DNA به این روش در واقع بر اساس وارد شدن ´3 و´2 دیداکسی نوکلئوتیدها به عنوان خاتمه دهندهها در زنجیرههای DNA تازه ساخته شده میباشد .در واقع واکنش تعیین توالی بر اساس ساخت یک رشته جدید DNA توسط یک DNA پلیمراز استوار میباشد که در محل اتصال یک پرایمر به مولکول DNA الگو تک رشته ای انجام میگیرد به طور کلی در مورد محصولات.PCR الگوی مورد استفاده دو رشته ای خواهد بود .لذا برای استفاده در واکنش تعیین توالی محصولات PCR ، حرارت داده میشوند تا دو رشته DNA از هم باز شوند و سریعاً از طریق قرار دادن در یخ خشک یا نیتروژن مایع، سرد میشوند، به طوریکه از اتصال مجدد رشته های جدا شده، جلوگیری شود .در این نوع تعیین توالی، که به صورت چهارواکنش مجزا (یک واکنش به ازا هر نوکلئوتید) انجام میگیرد، دیداکسی نوکلئوتیدهای تری فسفاته نیز وجود دارد وارد شدن یکddNTP به جای dNTP مربوطه باعث خاتمه سنتز زنجیره میشود، .زیرا عدم وجود گروهOH -´۳ درddNTP مانع از تشکیل پیوند فسفودی استر بعدی خواهد شد (Pherson *et al.*,).

بررسی توالیها به منظور تعیین پرایمر

در نهایت توالیها به منظور تعیین پرایمربا استفاده از نرم افزارهای ،Gene Runner، BioEdit وChromas و با روش چشمی آنالیز شد.

آنالیز آماری

انالیز اماری داده ها با استفاده از برنامه popgene و spssانجام گرفت . برنامه popgene با امتیاز دادن به نوارهای الکتروفورز انجام می گیرد. در این قسمت ، در صورت تکثیر و وجود نوار، امتیاز (۱) و در صورت عدم وجود نوار امتیاز (۰) در نظر گرفته شد.

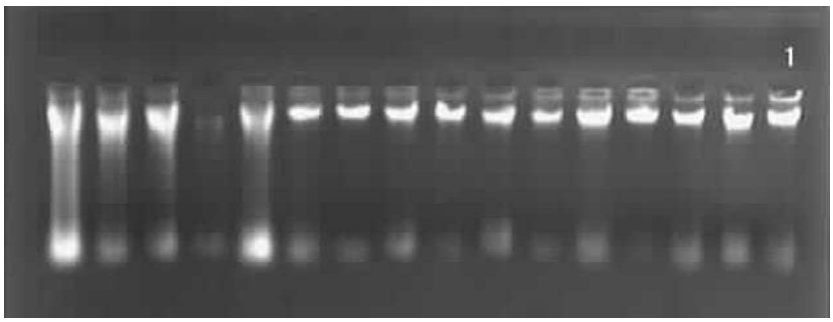
ابتدا میگوها به سه گروه سایزی مختلف(بزرگ، متوسط و کوچک) دسته بندی شدند. میزان شباهت و فاصله ژنتیکی با استفاده از معیار (Nei, 1972) و (Nei, 1978) ، دندروگرام فاصله زنتیکی بین گروههای مورد بررسی با استفاده از برنامه pop gene و میزان وراثت پذیری صفت وزن برا ی همه میگو ها با کمک برنامه SPSS محاسبه گردید.

۳- نتایج

نتایج بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

کمیت وکیفیت DNA به دو روش مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج ان به شرح ذیل میباشد.

الف)روش الکتروفوزی : بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (یک درصد) نشان داد که DNA های استخراج شده از پلیوپودمیگوی ایندیکوس به روش فنل-کلروفورم از کیفیت و کمیت قابل قبولی برای استفاده در آزمایش های PCR برخوردار می باشند. باندهای DNA بسیار قوی و شفاف بودند واین بیانگر انست که DNA استخراجی فاقد آلودگی پروتئینی ، فنلی ، آلودگی به RNA است(تصویر۴-۱)



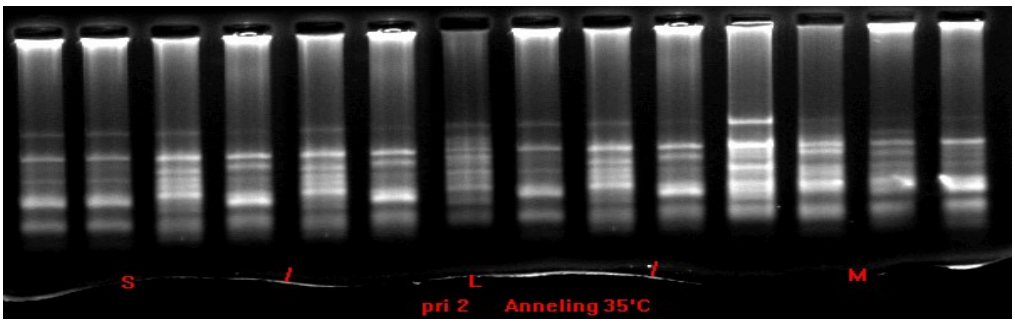
تصویر ۱-۳ . نمونه‌ای ازDNA استخراج شده به روش فنل- کلروفورم برروی ژل آگاروز ۱٪

اسپکتروفتومتری DNA

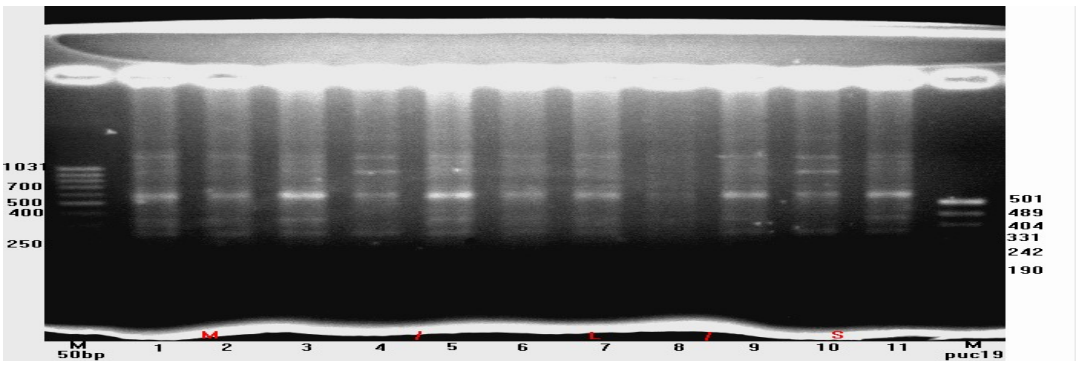
میزان جذب در طول موج ۲۶۰ nm وطول موج۲۸۰ nm بوسیله اسپکتروفتومتر محاسبه گردید ونسبت جذب طول موج ۲۶۰ به۲۸۰ نانومتر به عنوان شاخص کمیت می باشد. نمونه هائی که این نسبت برای آنها ۱/۸ تا ۲ بود انتخاب و در مورد نمونه های نامناسب استخراج DNA برای آنها تکرار گردید . غلظت DNA استخراجی بر اساس فرمول محاسبه شده در کلیه ۹۰نمونه بین ng/l ۲۵۰-۱۵۰ بود که پس از رقیق سازی و همسان سازی غلظت DNA ، در غلظتng/l ۱۰۰ مورد استفاده قرار گرفت .

نتایج حاصل از PCR

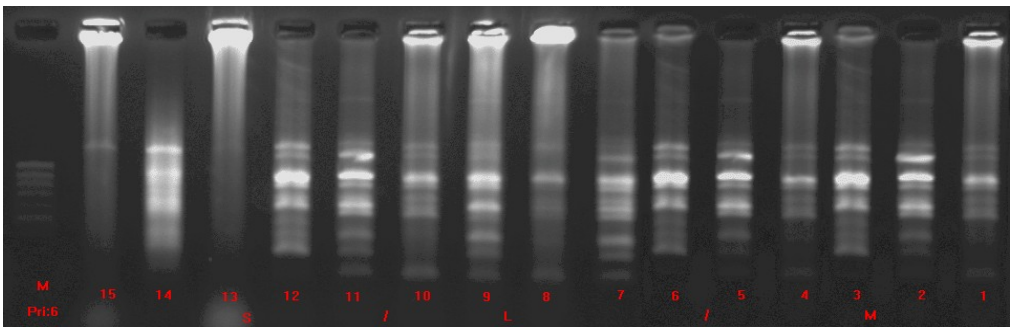
پس ازقرار دادن نمونه ها در دستگاه PCR مدت ۱,۵ ساعت برای تکمیل برنامه صرف گردیدوسپس محصول PCRبرروی ژل پلی اکریل آمید۶٪ الکتروفورزو با نیترات نقره رنگ آمیزی شد که نتایج زیر به دست امد.



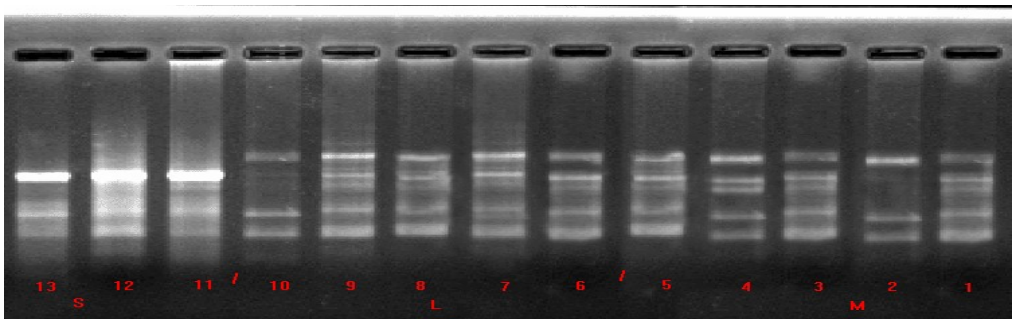
تصویر ۲-۳ محصول PCR وارایش باند DNA میگوی ایندیکوس بااستفاده از پرایمر OPAQ1



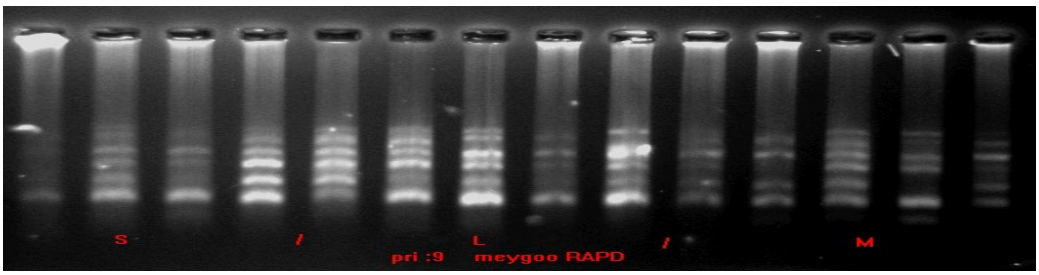
تصویر ۳-۳ محصول PCR وارایش باند DNA میگوی ایندیکوس بااستفاده از پرایمر OPAQ2



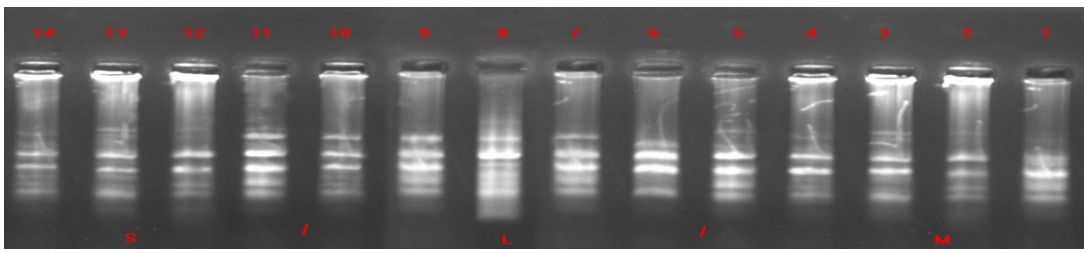
تصویر ٤-۳ محصول PCR وارایش باند DNA میگوی ایندیکوس بااستفاده از پرایمر OPAQ3



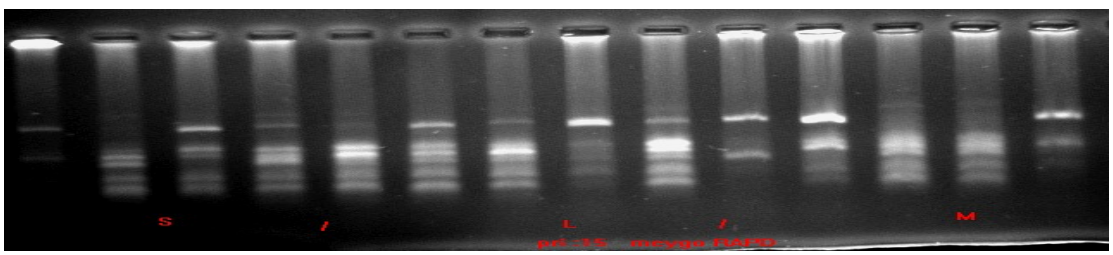
تصویر ۵-۳ محصول PCR وارایش باند DNA میگوی ایندیکوس بااستفاده از پرایمر OPAQ4



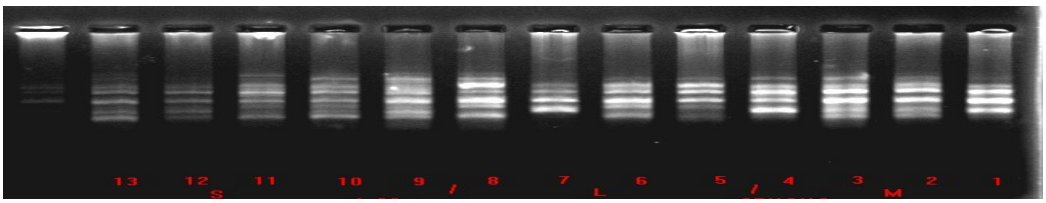
تصویر ٦- ۳محصول PCR وارایش باند DNA میگوی ایندیکوس بااستفاده از پرایمر OPAQ5



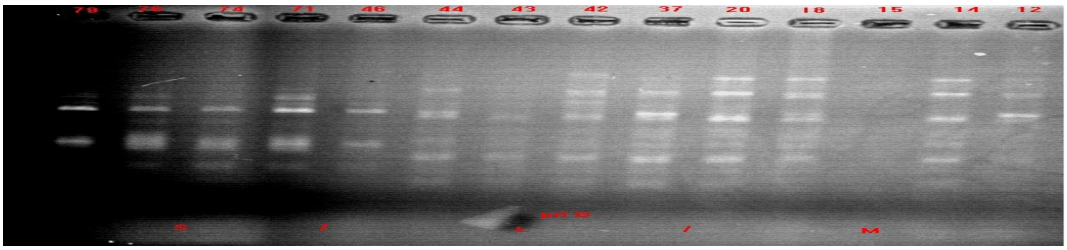
تصویر ۷-۳ محصول PCR وارایش باند DNA میگوی ایندیکوس بااستفاده از پرایمر OPAQ6



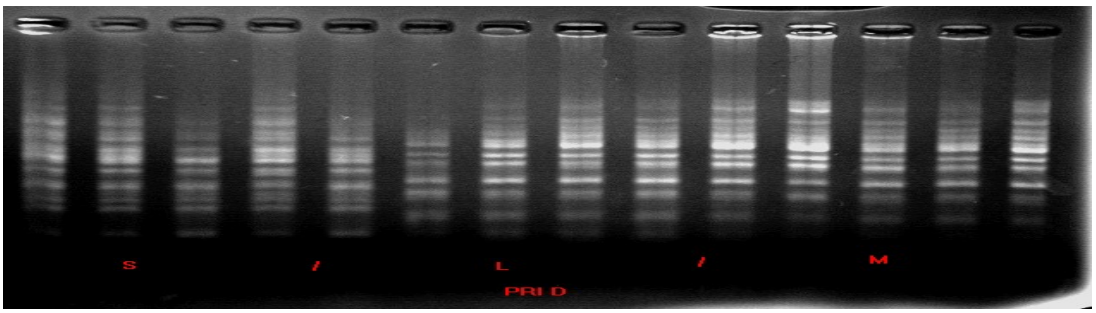
تصویر۸-۳ محصول PCR وارایش باند DNA میگوی ایندیکوس بااستفاده از پرایمر OPAQ7



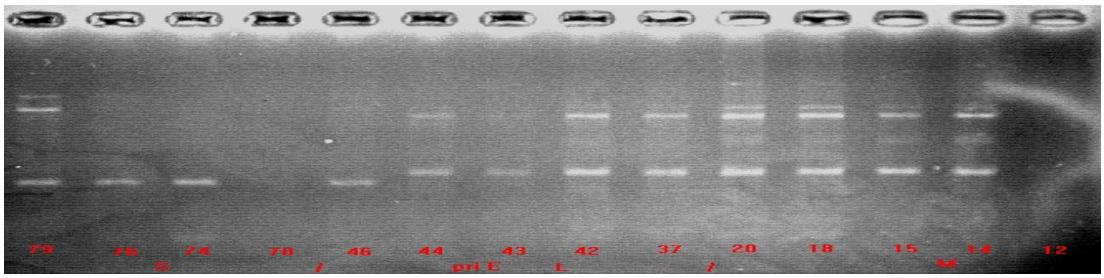
تصویر ۹-۳ محصول PCR وارایش باند DNA میگوی ایندیکوس بااستفاده از پرایمر OPAQ8



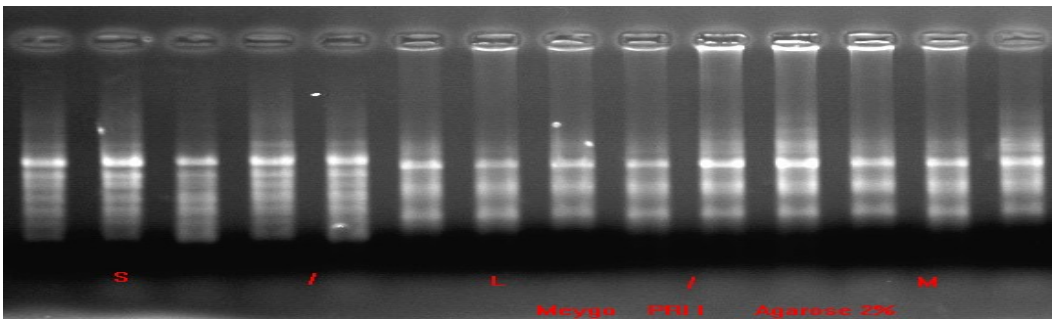
تصویر ۱۰-۳ محصول PCR وارایش باند DNA میگوی ایندیکوس بااستفاده از پرایمر OPAQ9



تصویر ۱۱-۳محصول PCR وارایش باند DNA میگوی ایندیکوس بااستفاده از پرایمر OPAQ10



تصویر ۱۲-۳ محصول PCR وارایش باند DNA میگوی ایندیکوس بااستفاده از پرایمر OPAQ11



تصویر ۱۳-۳ محصول PCR وارایش باند DNA میگوی ایندیکوس بااستفاده از پرایمرOPAQ12

از ۲۱ آغازگر مورد بررسی ۱۲ اغازگر نوارهای پلی مورفیک تشکیل دادند. در جدول۳-۱ ، نتایج کامل حاصل از اغازگرهای مختلف آمده است.

بیشترین نوارحاصله مربوط به اغازگر ۱۰ و کمترین مربوط به اغازگر ۱۱ می باشد. بیشترین نوار چند شکلی توسط آغازگر۹ و کمترین توسط اغازگر۷ حاصل شده است. از کل نوارهای تولید شده ، تعداد ۴۳ نوار را نوارهای چند شکل تشکیل می دهند که حدود۵۵درصد کل نوارها را به خود اختصاص می دهند.

جدول۳-۱ نتایج حاصل از آغازگرهای مختلف

شماره آغازگر	تعدادباندهای ایجاد شده	تعدادباندهای هم شکل	تعدادباندهای چند شکل
OPAQ۱	۷	۳	۴
OPAQ۲	۶	۶	-
OPAQ۳	۶	۳	۳
OPAQ۴	۶	۲	۴
OPAQ۵	۶	۴	۲
OPAQ۶	۶	۴	۲
OPAQ۷	۶	۵	۱
OPAQ۸	۷	۲	۵
OPAQ۹	۸	-	۸
OPAQ۱۰	۹	۲	۷
OPAQ۱۱	۵	-	۵
OPAQ۱۲	۶	۳	۳
جمع	۷۸	۳۴	۴۳

در مطالعه حاضر به دنیال بررسی مارکر اختصاصی برای رشد مشاهده گردید که ژنوتیپ ۱۱۱۱۰ در گروه با رشد متوسط، ژنوتیپهای ۰۰۰۰۱۰۱۱۱،۱۰۱۱۱۱،۰۱۱۱۰ ،۰۰۱۱۱۱،۰۱۱۱۱۱،۱۱۱۱۱۰۱،۰۱۰۰۱۰۱۱ در گروه با رشد زیاد، ژنوتیپهای ۱۰۰۰۱ ،۱۱۰۰۱۱،۰۱۱۰۱۱،۰۰۱۱۱۱،۰۰۰۰۱۱۱۰۰،۰۱۱۱۱۱۱۰۰،۰۱۱۰۱۱۱۰۰، ۱۱۱۱۰۱، ۱۰۱۱۰۱ ،۱۱۰۱۰۱۱ در گروه با رشد کم دیده شدند.

محاسبه میزان شباهت و فاصله بین گروهها

براساس فاصله Nei(1972) بیشترین فاصله بین گروه با اندازه متوسط و گروه با اندازه کوچک (۰,۴۵۷) و کمترین فاصله بین گروه با اندازه متوسط و گروه با اندازه بزرگ(۰,۰۹۱) به دست امد. همچنین بیشترین شباهت بین بین گروه با اندازه متوسط و گروه با بزرگ (۰,۹۱۲) و کمترین شباهت بین گروه با اندازه متوسط و گروه با اندازه کوچک(۰,۶۳۳۱) محاسبه گرید (جدول۳-۲).

جدول ۲-۳ شباهت ژنتیکی (بالای قطر) و فاصله ژنتیکی (زیر قطر) براساس فاصله Nei(1972)

	گروه متوسط	گروه بزرگ	گروه کوچک
گروه متوسط	***	۰,۹۱۲	۰,۶۳۳
گروه بزرگ	۰,۰۹۱۶	***	۰,۶۴۶۹
گروه کوچک	۰,۴۵۷۱	۰,۴۳۵۵	***

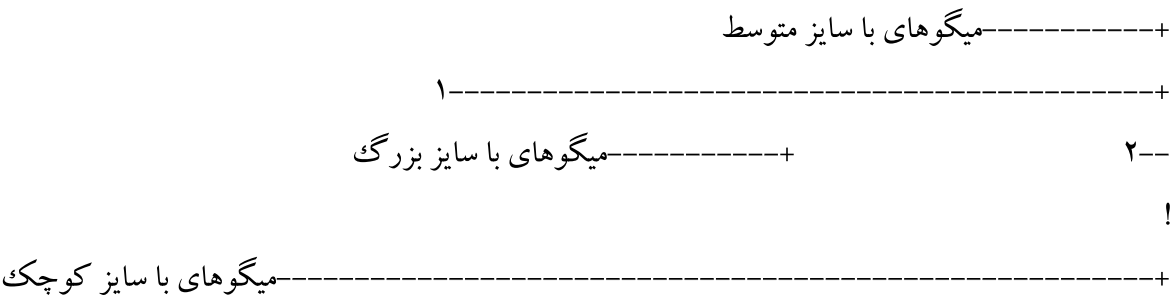
براساس فاصله Nei(1978) بیشترین فاصله بین گروه با اندازه متوسط و گروه با اندازه کوچک (۰,۴۵۶) و کمترین فاصله بین گروه با اندازه متوسط و گروه با اندازه بزرگ(۰,۰۹۰۶) به دست امد. همچنین بیشترین شباهت بین بین گروه با اندازه متوسط و گروه با اندازه بزرک (۰,۹۱۳) و کمترین شباهت بین گروه با اندازه متوسط و گروه با اندازه کوچک (۰,۶۳۳۴) محاسبه گرید (جدول۳-۳).

جدول ۳-۳ شباهت ژنتیکی (بالای قطر) و فاصله ژنتیکی (زیر قطر) براساس فاصله Nei(1972)

	گروه متوسط	گروه بزرگ	گروه کوچک
گروه متوسط	***	۰,۹۱۳۴	۰,۶۳۳۴
گروه بزرگ	۰,۰۹۰۶	***	۰,۶۴۷۸
گروه کوچک	۰,۴۵۶۶	۰,۴۳۴۲	***

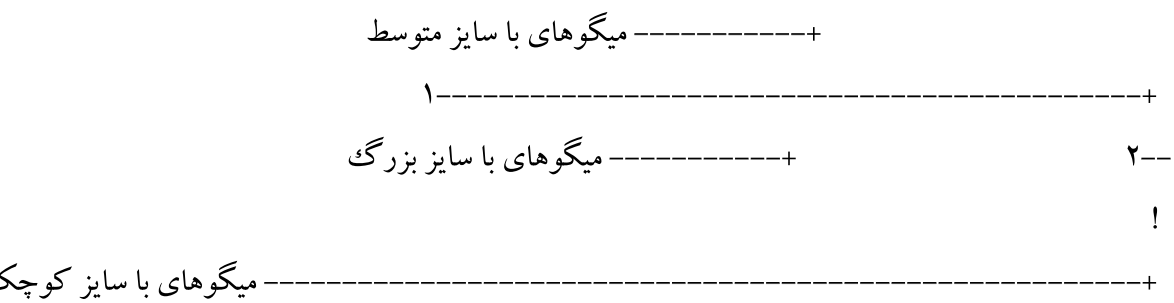
دندروگرام گروههای مختلف سایزی

دندروگرام فاصله ژنتیکی براساس فاصله Nei(1972) میگوهای با سایز متوسط و بزگ را در یک گروه و سایز کوچک را در گروه جداگانه ای قرارداد.



دندروگرام فاصله ژنتیکی براساس فاصله Nei(1972) با استفاده از متد UPGMA

دندروگرام فاصله ژنتیکی براساس فاصله Nei(1978) میگوهای با سایز متوسط و بزگ را در یک گروه و سایز کوچک را در گروه جداگانه ای قرارداد.



دندروگرام فاصله ژنتیکی براساس فاصله Nei(1978) با استفاده از متد UPGMA

وراثت پذیری hertability (h^2)

با در نظر گرفتن میانگین وزنی نتاج حاصله (نسل F1) ۱,۵±۱۶,۲، میانگین وزنی گله۱,۲ ± ۱۵، میانگین وزنی والدین مورد بررسی ۳۱,۶، میزان پاسخ به بهگزینی(R) ۰,۲±۱,۲ و میزان وراثت پذیری برای صفت رشد در این مطالعه ۰,۰۱±۰,۰۷ تخمین زده شد.

ا ختلاف آماری طول و وزن سه گروه مورد بررسی

با استفاده از آنالیزواریانس یک طرفه ANOVA اختلاف طولی و وزنی سه گروه مورد بررسی مورد بررسی قرار گرفت و معنی دار بودن تفاوت میان گروهها را نشان داد ($p\leq0.00$).

مقادیر میانگین و جدول آنالیز واریانس گروهها برای فاکتورهای طول و وزن در جدول ۲آمده است:

جدول ۲. آنالیزواریانس و مقادیر(میانگین±انحراف معیار) طول و وزن گروههای سایزی متفاوت

نوع ترکیب	منابع تغییر (SV)	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (ss)	میانگین مربعات (MS)	محاسبه شده f	سطح معنی داری P
طول	تیمار	۲	۲۹/۲۹	۱۴/۶۴	۲۱/۳	۰/۰۰
	تکرار	۸۷	۵۹/۸۱	۰/۶۸	-	-
	کل	۸۹	۸۹/۱۱	-	-	-
وزن	تیمار	۲	۴۴۵/۴	۲۲۲/۷	۸۲/۱۲	۰/۰۰
	تکرار	۸۷	۲۳۵/۹	۲/۷	-	-
	کل	۸۹	۶۸۱/۳۱۱	-	-	-

فاکتور	سایز کوچک	سایز متوسط	سایز بزرگ
طول	۱۲/۲۸±۰/ ۵۶^a	۱۳/۱۲±۱/ ۲۵^b	۱۳/۶۷±۰/۴۳^c
وزن	۱۳/۷۴±۱/۹۵^a	۱۵/۷۵±۱/۵۳^b	۱۹/۱±۱/۴^c

نتایج برای معرفی نشانگر DNA برای غربالگری مولدین

الکتروفورز ژل آگارز

بررسی شدت وضوح باندهای DNA نمونه های مورد نظر بر روی ژل آگارز باندهای DNA قوی و شفاف را نشان داد باندهای DNA بسیار قوی و شفاف بودند.

نتایج قطع باند DNA پلی مورف

با استفاده از سایز مارکر باند مورد نظر شناسایی شد و جداسازی آن از سایر باندهای ایجاد شده صورت گرفت. قطع باند DNA از ژل روشی در جهت خالص سازی و تکثیر آن به تعداد قابل قبول برای تعیین توالی بود.

نتایج کلون باند DNA پلی مورف خالص شده

به این علت که غلظت محصول PCR خالص شده از ژل برای تعیین توالی کافی نبود، کلون سازی روی نمونه ها انجام گرفت و در نتیجه نمونه ها با غلظت استاندارد برای تعیین توالی ارسال شد.

تعیین توالی (Sequencing) مستقیم محصولات PCR

بررسی توالیها به منظور تعیین پرایمرنشان داد که قطعه مورد نظر در کلون یک ، قطعه ای ۶۱۷ بازی می باشد. تفاوتی بین کلون یک و دو از نظر توالی وجود نداشته و تنها کلون شماره دو ۶۱ جفت باز کمتر قرائت گردیده است.

نتایج تعیین توالی کلون یک (T6 2.2 TA Kit)

محصول مورد انتظار PCR ۵۶۵ جفت باز خواهد بود و محل پرایمر Forward با توالی CCGTATTAGACTCATCGGTACG 5' 3' که از نوکلئوتید ۲۶ شروع و به نوکلئوتید ۴۸ ختم و پرایمر Reverse با توالی 5' GTCCGAAAGATGGCCATATAG 3' از ۵۹۰ شروع و به ۵۷۰ ختم می شود، در ساختمان توالی ژن ذیل با رنگ متفاوت مشخص گردیده است.

پرایمر Forward:

Tm: 64.1
%GC: 50

پرایمر Reverse:

Tm: 63.7
%GC: 47.6
AAGTCTTCGCTTAAGATGACGATAACCGTATTAGACTCATCGGTACGAAGAAAATCCTTACCGTTC
TCGATATTAGAGGTAGACGCGATACTGTTTATAAAATTACACATAATCGCGTTTCTAGTTTTCTTGT
GACGATAACAATAATAATAGTAGTGATAATACTGTTAATGATAACATTAACGGTCTCTCCGTACAT
GATATCTATTAATATATTTATTCGTTAATTGTCGACATTACATCATCGCTATCAATCTTTTACATATT
TGTGTATCAACTTCAAACTCGTCGGTATCGAAAGATGCGGAATTAGCTTTTCCACCACCGCCTCTTT
AGTTGGAGCGGGTAATGCGTTCATATTCGGTAATGTGTCCAGTTCTAGGTAACCGTATATGCTATTT
GGGCGAATACTCTTTAGATATTTACTCTTGATATGGAACACGAGTGAATATAGTAGCGCAATTAGC
AGCATCCAATATAAAAATGTTAAGAGTGGCATTTCACCAGACGTGTATATCGATAAGCGTCCCCAA
TCGCACACAATAACGAGAATAGCGATTTTAATATATCTATATGGCCATCTTTCGGACAGCTCGGCA
ATCAAGC

نتایج تعیین توالی کلون دو (2.2V TA Kit)

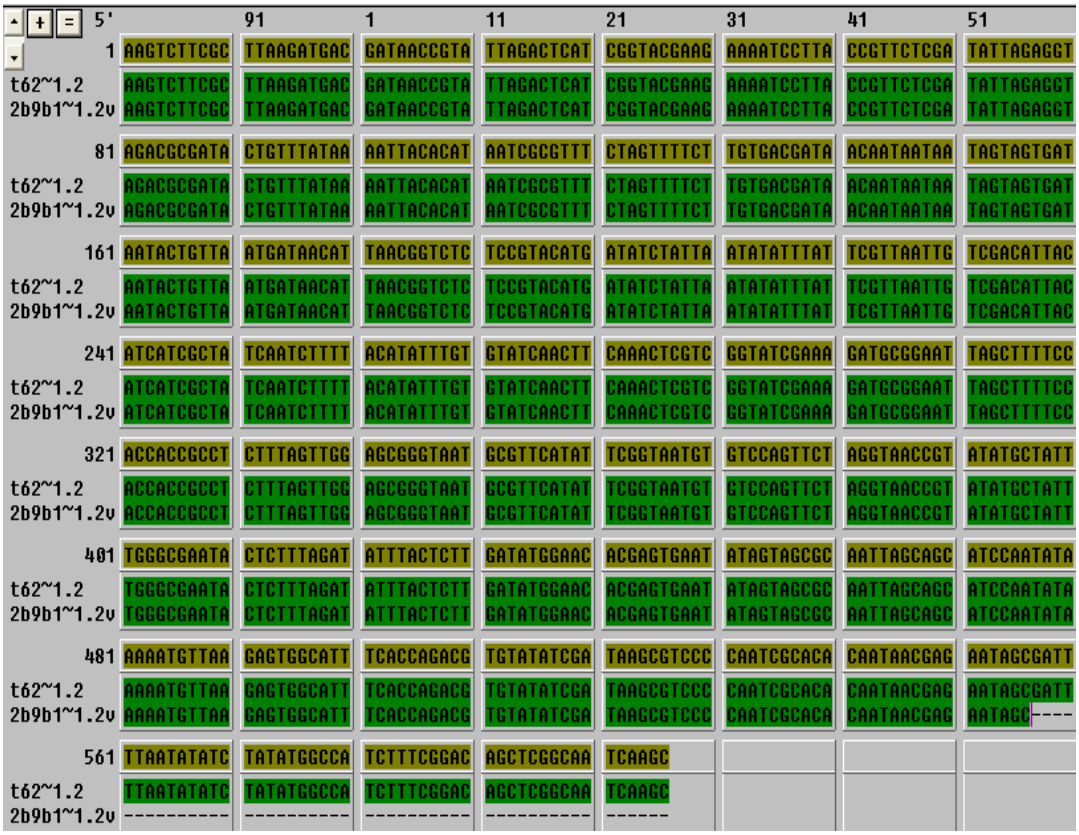
این توالی در مقایسه با توالی انجام شده برای کلون یک در ابتدا کاملا مشابه اما در انتها ۶۱ جفت باز کوتاه تر

می باشد و در نهایت محصول تعیین توالی شده ۵۵۶bp است.
AAGTCTTCGCTTAAGATGACGATAACCGTATTAGACTCATCGGTACGAAGAAAATCCTTACCGTTC
TCGATATTAGAGGTAGACGCGATACTGTTTATAAAATTACACATAATCGCGTTTCTAGTTTTCTTGT
GACGATAACAATAATAATAGTAGTGATAATACTGTTAATGATAACATTAACGGTCTCTCCGTACAT
GATATCTATTAATATATTTATTCGTTAATTGTCGACATTACATCATCGCTATCAATCTTTTACATATT
TGTGTATCAACTTCAAACTCGTCGGTATCGAAAGATGCGGAATTAGCTTTTCCACCACCGCCTCTTT
AGTTGGAGCGGGTAATGCGTTCATATTCGGTAATGTGTCCAGTTCTAGGTAACCGTATATGCTATTT
GGGCGAATACTCTTTAGATATTTACTCTTGATATGGAACACGAGTGAATATAGTAGCGCAATTAGC
AGCATCCAATATAAAAATGTTAAGAGTGGCATTTCACCAGACGTGTATATCGATAAGCGTCCCCAA
TCGCACACAATAACGAGAATAGC

مقایسه توالی دو کلون (T62.2 TA Kit) و (2.2V TA Kit) :

کلون (T62.2 TA Kit) و (2.2V TA Kit) از باز اول تا باز ۵۵۷ کاملا مشابه بوده ، در عین حال که کلون (T62.2 TA

Kit) ۶۱ جفت باز طویلتر ازکلون (2.2V TA Kit) توسط دستگاه Sequencer قرائت گردیده است.



جستجو در Gene Bank برای تعیین هویت نشانگر شناسایی شده :

توالی کلون شماره یک با ۶۱۷ جفت باز با دستور Blast به جستجوی شناسایی ژنهای مشابه در بانک ژن جهانی (Gene Bank) پرداخته شد و مشخص گردید اولا توالی به دست آمده در خود نقاط مشابه با ژنوم هیچیک از وکتورها و از جمله پلاسمید مورد استفاده در کلونینگ را ندارد و از طرف دیگر مشخص گردید با بخشی از ژنوم گورخر ماهی (Zebrafish) که مربوط به کروموزوم ۱۷ آن می باشد دارای ۸۶ درصد نقاط مشابه در ۸ درصد توالی می باشد. در پنج مورد با توالی کلون های مربوط به Zebrafish که تعیین توالی و در Gene Bank ثبت شده اند با سطوح مختلف مشابهت نشان داده است.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CU464069.14	Zebrafish DNA sequence from clone CH73-275L12 in linkage group 17, complete sequence	57.2	185	8%	1e-04	86%
CR407597.19	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-40C23 in linkage group 11, complete sequence	57.2	98.2	7%	1e-04	92%
XM_640714.1	Dictyostelium discoideum AX4 hypothetical protein (DDB_G0271114) mRNA, complete cds	57.2	57.2	8%	1e-04	83%
AY190943.1	Drosophila virilis clone DVIF01_25_B23 (D1415) genomic sequence	57.2	142	7%	1e-04	86%
BX950854.12	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-125M22, complete sequence	57.2	342	7%	1e-04	88%
BX927093.8	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-53P2 in linkage group 11, complete sequence	57.2	98.2	7%	1e-04	92%
FP236598.13	Zebrafish DNA sequence from clone CH73-212N14, complete sequence	53.6	149	7%	0.001	85%
FN357385.1	Schistosoma mansoni genome sequence supercontig Smp_scaff000094	53.6	142	8%	0.001	82%
FN357292.1	Schistosoma mansoni genome sequence supercontig Smp_scaff000001	53.6	271	7%	0.001	85%
XM_632372.1	Dictyostelium discoideum AX4 hypothetical protein (DDB_G0286921) mRNA, complete cds	53.6	53.6	7%	0.001	85%
XM_631295.1	Dictyostelium discoideum AX4 myb domain-containing protein (mybI) mRNA, complete cds	53.6	183	8%	0.001	83%
AC131671.3	Mus musculus BAC clone RP23-312H8 from chromosome 3, complete sequence	53.6	53.6	7%	0.001	86%

٤- بحث

Garcia و Benzie (۱۹۹۵) درمطالعه امکان استفاده ازمارکرRAPD در برنامه های بهگزینی ازDNA استخراجی از پلیوپود میگواستفاده کردند.Wolfus و همکاران (۱۹۹۷) نیز درمطالعه میگوی وانامی از روشی که توسط Garcia و همکاران (1995) برای این گونه تعدیل شده بود استفاده کردند. در این مطالعه به جهت بالا بودن کمیت و کیفیت DNA استخراجی ، روش تعدیل شده فنل کلروفرم (پورکاظمی ،۱۹۹۶) برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت، که در طی انجام PCR مشکلی از لحاظ تولید باندها و اللها وجود نداشت و لذا توصیه می گردد این روش برای استخراج DNA میگوها و دکاپودها مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه از ژل اگاروز ۳٪ و رنگ امیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد .

برنامه های اصلاح نژاد درآبزی پروری در مقایسه با خشکزیان بسیار نادر است. اغلب پرورش دهندگان میگو ، برای تامین ذخایر استخرهای پرورش مستقیما از پست لاروهای صید شده از دریا استفاده می کنند که ابهاماتی درمورد فشار این برداشتها برجمعیتها (Li *et al*., 2006) ، ایجاد مشکلات صید ضمنی (Naylor *et al*., 2000) ، انتقال بیماریها (Lightner *et al*., 2003) وجود دارد. بدین منظور و برای کاهش و جلوگیری از ایجاد چنین مشکلاتی استفاده از روش های اصلاح نژاد و بهبود ژنتیکی می تواند سودمند باشد. هم اوری بالا، زمان تولید نسل کوتاه و پاسخ مناسب به انتخاب ، امیزش انتخابی مولدین اهلی تحت شرایط ایمنی زیستی ، فرصت را برای افزایش تولید در اکثرگونه های اقتصادی میگوی پنئیده میگو به ویژه در نیمکره غربی را فراهم آورده است

(Browdy, 1998 ; Davis and Hatzel, 2000; Hatzel *et al*., 2000)

تجارب و نتایج برنامه های به گزینی ژنتیکی و اصلاح نژاد که طی چند دهه گذشته در ماهی حاصل شده است(اتلانتیک سالمون و قزل الای رنگین کمان (Gjedrem and fimland, 1995) ؛ Eknath *et al*., 1993.) به صنعت تکثیر و پرورش میگومنتقل نشده ، لذا اطلاعات ژنتیکی و اصلاح نژاد در میگو مراحل ابتدایی را طی می کند و افزایش تولید و توسعه صنعت میگو در طی چند دهه گذشته اصولا به دلیل افزایش فاحش سطح استخرهای پرورشی بوده تا افزایش بازده تولید در واحد سطح. در میگوی پنئیده ، کارهای ابتدایی ژنتیکی در زمینه اهلی کردن و پرورش در سیستم بسته و اخیر تلاشهایی در زمینه به گزینی صفاتی همچون رشد و مقاومت به بیماریها،

کاهش FCR غذایی،....انجام گرفته است (Hatzel *et al*., 2000 ;Goyard *et al*., 2002 ;Argue et al., 2002;Donato *et al*., 2005) .

Pullan و همکاران (۱۹۹۸) روند کند توسعه برنامه های اصلاح نژاد را به تنوع ژنتیکی پایین میگو و مشکلاتی که در اهلی کردن میگو در گذشته وجود داشته نسبت دادند. بنابراین ،برطرف نمودن این ابهامات و تخمین پاسخ به بهگزینی و وراثت پذیری صفات امری ضروری می نماید(Hetzel *et al*, 2000) . مطالعات زیادی در زمینه بهگزینی میگو Hetzel *et al*., 2000; Prestn *et al*, 2004; Goyard et al, 2002 ، وراثت پذیری سایز درمیگو Benzie *et al*., 1997 ، وراثت پذیری رشد در میگو Hetzel *et al*., 2000 ، با استفاده از ژنتیک کمی صورت گرفته است. علاوه بر ژنتیک کمی ، مارکرهای ژنتیکی می توانند جهت برنامه های به گزینی برای بهبود کارایی انتخاب برای صفاتی با وراثت پذیری پایین به کار برده شوند (Moore et al., 1999) .

کاربرد روشهایی همچون RFLP و RAPD برای مشخص کردن تفاوت بین جمعیتها و خانواده های وحشی و با سلامتی بالا (High health) وانامی توسط Garcia و همکاران (۱۹۹۵) گزارش شد.

مطالعه Garcia و همکاران (۱۹۹۵) در مورد امکان استفاده از نشانگرRAPD در برنامه های بهگزینی نشان داد که قبل از استفاده از این روش به عنوان نشانگر وراثت پذیری، می بایست پلی مورفیسم RAPD مورد بررسی قرارگیرد.

مطالعه حاضر نیز با هدف امکان استفاده از روشRAPD درپیدا کردن نشانگر رشد و برنامه بهگزینی انجام گرفت. به جهت میزان کم DNA مورد نیاز در آنالیز RAPD می توان بدون آسیب رساندن به میگو با جدا نمودن یکی یا دو تا از پلیوپودها ، همچنان ازهمان میگو در برنامه های اصلاح نژاد استفاده نمود.

اکثر مطالعات صورت گرفته در زمینه بهگزینی در شرایط کنترل شده تانکها انجام گرفته است Donato *et al*., 2005) و Keys *et al*., 2004)

واریانس محیطی که طبق تعریف شامل تمام تغییرات غیر ژنتیکی می شود ، می تواند علتهای گوناگونی داشته باشد و ماهیت ان بستگی به صفت و جاندار مورد مطالعه دارد. به طور کلی واریانس محیطی منبع خطایی است که از دقت مطالعات ژنتیکی می کاهد و بنابراین هدف آزمایشگر یا اصلاح گر این است که این واریانس را تا

حد امکان به کمک طرح آزمایشهای مناسب روشهای دقیق کاهش دهد. عوامل تغذیه ای و آب و هوایی رایج ترین عوامل خارجی تغییرات محیطی هستند و می توان قسمتی از انها را با ازمایش کنترل کرد (Falconer, 1989) .

Preston و همکاران (۲۰۰۴) نیز در در مقایسه رشد میگوی *Penaeus(Marsupenaeus) japonicus* بهگزین شده و نشده در مطالعه ای در مقایسه استخرهای تجاری (باز) پرورش و تانکهای پرورش دریافتند که در صورتی که شرایط محیطی در دامنه قابل قبولی برای این گونه باشد، میزان رشد در دو شرایط کنترل شده و نشده اختلاف معنی داری را نشان نمی دهد. Hetzel و همکاران (۲۰۰۰) مطالعه خود را با پیش فرض در راستای هم بودن رشد در استخر و تانکهای پرورش (به علت عدم وجود گزارشی در رابطه با ارتباط ژنتیکی رشد در استخر و تانکهای پرورش) در شرایط متفاوت بودن محیط نگهداری والدین و فرزندان انجام دادند.

مطالعه حاضر درشرایط باز استخرکه در طول دوره پرورش شرایط محیطی (دمای آب، هوا،...) در رنج مطلوب برای گونه سفید هندی بوده، صورت گرفته است.

وراثت پذیری یکی از مهمترین خصوصیات یک صفت کمی است و قسمتی از واریانس کل را شامل می شود که به اثرهای متوسط ژن ها مربوط است و این عاملی است که درجه شباهت بین خویشاوندان را تعیین می کند، اما مهمترین نقش وراثت پذیری در مطالعه ژنتیکی، نقش پیش بینی کننده آن است که حد اطمینان ارزش فنوتیپی افراد را به عنوان راهنمایی برای ارزش زاداوری آنها نشان می دهد(Hoa, 2009). میزان وراثت پذیری برای صفت وزن درگونه مورد بررسی ۰,۰۷ تخمین زده شد.

Benzie و همکاران (1997) وراثت پذیری صفت رشد را ۰,۵۴ ±0.39 در *P. monodon*

تخمین زد و این میزان کم را به کاهش شدید تنوع و فقدان مراقبتهای ژنتیکی در طی دوران اهلی کردن این گونه نسبت دادند.

میزان وراثت پذیری برای صفت وزن برداشتی در *Lito . vanamei* توسط Carr و همکاران (۱۹۹۷) 0.15 ± 0.42 ؛ در *Lito . vanamei* توسط Perez-Rostro (1999) 0.18 ± 1.32؛ در *Metap . japonicus* توسط Hetzel و همکاران (۲۰۰۰) 0.2 ± 0.16 ؛ در *Lito . vanamei* توسط Gitterle et al., (2005) 0.05 ± 0.24 در امیزش (full-sib) ؛ 0.04 ± 0.17 در امیزش (half-sib) تخمین زده شد

Argue و همکاران (۲۰۰۲) میزان وراثت پذیری را برای صفت رشد ۰,۱۲ ± ۱ ، برای صفت مقاومت به بیماری ۰,۱۲ ± 0.28 و برای صفت درصد دم ۰,۱۲ ± 0.28 ، در *Lito vanamei* اعلام کرده و بیان کردند صفت رشد درمیگو صفتی با وراثت پذیری بالا می باشد.

میزان وراثت پذیری برای طول بدن در سن ۱۱۹ روزگی ۰,۲۲ توسط (Perez-Rostro *et al*, 2003)، در سن ۲۵ روزگی ۰,۴۳ توسط (Campos *et al*., 2006) در *Lito vanamei* اعلام شد.

داده های بدست آمده از هچریهای مختلف با توانایی های متفاوت این مسئله که تفاوتهای ژنتیکی در تعیین سایز و رشد میگوی پنئیده مهم هستند را تائید می کند(Chow and Sandifer, 1991) ، اما تخمینی از کنترل ژنتیکی در مورد وراثت پذیری صفت رشد در میگوی پنئیده وجود ندارد. رنج وراثت پذیری صفات (۱-۰) در مراحل لاروی ، پست لاروی پنئوس Vanemei و Stirostris نیز تاثیر فاکتورهای محیطی را بررشد لارو در میگو ثابت می کند(Lester and Lauser, 1990) .

Argue و همکاران (۲۰۰۲) برای اولین بار وراثت پذیری جمعیت را در *Litop . vanamei* مورد بررسی قرار داد ه و میزان ان را صفرتخمین زدند که نتیجه بدست امده بر خلاف نتیجه بدست امده در ماهی و لاک پشت توسط(Janzen, 1992; Lester *et a*l., 1989) است و حاکی از این مطلب است که در تولید میگوهایی تک جنسی (تمام ماده) به جای استفاده از امیزش بهگزینی باید از روشهای دستکاری غدد درون ریز یا استفاده از هورمون خارجی استفاده کرد(Sagi and Cohen, 1990) .

پیش بینی پاسخ در اصل فقط برای یک نسل معتبر است. مقدار پاسخ بستگی به وراثت پذیری صفت در نسلی دارد که والدین از ان گزینش یافته اند. بنابراین پاسخها در نسلهای بعدی به معنی واقعی کلمه نمی توانند بدون تعیین دوباره وارث پذیری درهرنسل پیش بینی شوند. دلیل تغییر وارث پذیری بر دو مبنا استوار است: اولا، در صورت وجود پاسخ می بایست فراوانیهای ژنی نیز تغییر یابند و می دانیم که وراثت پذیری به فراوانیهای ژنی بستگی دارد. این تغییر احتمالا مدت طولانی ظاهر نمی شود، زیرا تغییرات فراوانی ژنی ، به جز مواقعی که فقط تعداد کمی از مکانهای ژنی در کارند کوچک هستند. ثانیا ، گزینش والدین سبب کاهش واریانس وراثت پذیری در نسلهای اولیه می گردد. با این حال تغییرات مورد انتظاردر وراثت پذیری بزرگ نیستند، آزمایشات نشان داده اند که پاسخ به گزینش معمولا در طول چند نسل ، تا ۵ یا بیشتر ، با تغییرات اندکی همراه است، اما با

افزایش تعداد نسل بیش از این مقدار ممکن است واریانس فنوتیپی و وراثت پذیری کاهش یافته و موجب کاهش میزان تغییرات ژنتیکی گردند(Falconer, 1989) . میزان پاسخ به بهگزینی در مطالعه حاضر ۱,۲ تحمین زده شد. Preston و همکاران (۲۰۰۴) نیز در مطالعه مقایسه میزان رشد میگوی بهگزین شده*Metap . japonicus* بعد از یک نسل و چهار نسل بهگزینی رشد بالاتری را بعد از چهار نسل بهگزینی نسبت به یک نسل بهگزینی مشاهده کردند ، اما این اختلاف رشد معنی دار نبود.

Garcia و Benzie (۱۹۹۵) در مطالعه امکان استفاده از مارکر رپید ، در برنامه های به گزینی ، مطالعات خود را دریک نسل انجام دادند.

Hetzel و همکاران (۲۰۰۰) میزان وراثت پذیری و پاسخ به بهگزینی را در یک نسل مورد بررسی قرار دادند.

Goyard و همکاران(۲۰۰۲) در مطالعه امیزش بهگزینی برای صفت رشد و تحمل به بیماری در*Lito . vanamei* میزان وراثت پذیری را در یک نسل مورد بررسی قرار داد.

Pantoja و همکاران (۲۰۰۵) در تولید جمعیت SPF بهگزینی را دریک نسل انجام دادند.

مطالعه حاضر نیز در یک نسل انجام گرفت و صفت رشد بهگزینی بالاتری را نسبت به والدین نشان داد.

مطالعات الوزایمی تنوع ژنتیکی پایینی را در میگو ها نشان داده است(Nelson and Hedgecock, 1980) ، اما Lester در سال ۱۹۸۳ تنوع الوزایمی مشاهده شده در میگوی پنئیده را ۲۵-۳۵ درصد تخمین زد و این تنوع را برای تشخیص مولدین و برنامه های اصلاح نژاد مناسب دانست.

میزان تنوع ژنتیکی با استفاده از مارکر RAPD در این مطالعه ۲۲ درصد تخمین زده شده است.مطالعه میگوی مونودون با استفاده از مارکر RAPD توسط Garcia و Benzie (۱۹۹۵) تنوع پایین ۷-۶ ٪ را در این گونه نشان داد که با تنوع مشاهده شده در ارگانیزم های دیگر با استفاده از مارکر RAPD (Kazan et al., 1993) همخوانی دارد. Garcia و Benzie (۱۹۹۵) میزان تنوع ژنتیکی به دست امده ازاین مارکر را برای برنامه های اصلاح نژاد مناسب و کافی دانست .

Amato و Corach(۱۹۹۶) دو جمعیت *Macrobracium borelli* را با استفاده از تکنیک RAPD مورد بررسی قرار داد و همانند سایر ده پایان سطح بالایی از تنوع در این گونه بوسیله مارکرهایRAPD مشاهده شد.

مطالعه میگوی وانامی با استفاده از مارکر مایکروساتلایت تنوع بالایی را ۱۰۰-۴۵ ٪ را در این گونه نشان دادکه حاکی از مناسب و مفید بودن این مارکر در برنامه های اصلاح نژاد می باشد.

برنامه های اصلاح نژاد به منظور بهبود صفات اقتصادی همچون رشد، مقاومت به بیماریها و کاهش FCR باید به صورت اصولی و با مراقبت بسیار صورت گیرد. زیرا مسائلی همچون درون امیزی که ممکن است منجر به بهبود یک صفت مثلا رشد گردد، در سطوح هم خونی بالاتر به صورت فشار درون امیزی بر روی سایر صفات مرتبط با شایستگی همچون تنوع ژنتیکی تاثیر منفی خواهد گذاشت که البته حساسیت نسبت به هم خونی در میان تیره ها و جمعیتهای یک گونه متغیر است (اریک ، ۱۳۸۴).

برنامه های امیزشی در دامها و ماهی نشان داده که برنامه های به گزینی (selection)با امیزشهای کنترل نشده و در جمعیتهای کوچک منجر به آمیزش خویشاوندی (inbreeding) و کاهش تنوع در جمعیتها شده است (Bierne *et al.*, 2000; Falconer, 1998).

بررسی شباهت و فاصله ژنتیکی با استفاده از دو مقیاس Nei, 1972 و Nei, 1978 بیشترین شباهت ژنتیکی را بین میگوهای با سایز متوسط و کوچک و کمترین شباهت ژنتیکی را بین میگوهای با سایز متوسط و بزرگ نشان داد و بتبع ان بیشترین فاصله بین میگوهای با سایز متوسط و بزرگ و کمترین فاصله بین میگوهای با سایز متوسط و کوچک مشاهده شد. -

Dong و Zhou(۱۹۹۸) با استفاده از انالیز رپید ، سه واریته مختلف کپور معمولی Russian mirror carp, German mirror, Xingguo red carp: (Cyprino carpio) را مورد بررسی قرار داد ند و از بین ۴۰ پرایمر تصادفی ۱۰ مری، ۲۷ پرایمر پلی مورفیسمهایی بین سه جمعیت را نشان دادند و ۱۵۵ قطعه پلیمورفیک از این پرایمرها بدست آمد. از این طریق شاخصهای شباهت و فواصل ژنتیکی درون و بین سه جمعیت کپور مورد نظر محاسبه شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان شباهت درون جمعیتی متعلق به German mirror carp بود و بیشترین تفاوتها نیز بین همین دو جمعیت مشاهده شد.

در مطالعات تنوع، فیلوژنی سوالات مربوط به رابطه خویشاوندی گونه های مختلف وتغییرات ناشی از عوامل طبیعی را پاسخ میدهد. بر این اساس با افزایش شباهت بین مولکولهای توارثی در بین موجودات خویشاوندی آنها نیز افزایش می یابد و به همین خاطر در اکثرموجودات از داده های مولکولی برای تعیین روابط خویشاوندی

استفاده میشود مزیت استفاده از داده های مولکولی برای تعیین روابط خویشاوندی این است که داده های فوق کمتر تحت تاثیر انتخاب قرار میگیرند و بهتر میتواند روابط واقعی را نشان دهند. مطالعه دندروگرام گروههای مورد بررسی (میگوهای با سایزمتوسط ،بزرگ و کوچک) براساس UPGMA(Nei, 1972 , 1978) میگوهای با سایزمتوسط و بزرگ را در یک کلاستر و میگوهای با سایز کوچک را در کلاستر دیگر نشان داد.

Harding و همکاران (۱۹۹۷) روابط ژنتیکی ما بین زیرجمعیتهای لابستر امریکایی (*Hormarus americanus*) را با استفاده از تکنیک رپید مورد بررسی قرار دادند و طبق تاریخچه زندگی لابستر امریکایی نشان داده شد که مهاجرت بالغین و پراکنش لاروی می تواند در خلیج Marine قابل توجه باشد. مطالعه این تحقیق اشکارکرد که از بین ۴ منطقه خلیج Marine ، خلیج Georges bank, St.Lawrnce, Lobster bay کمترین دگرگونی ژنتیکی جمعیت لابستر در خلیج Marine و خلیج St.Lawrnce ظاهر شده است. بنابراین تخمین تعداد مهاجرین در یک نسل مابین کل مناطق در یک بافت اکولوژی کم (حداقل کمتر از ۱۰۰ عدد) بوده است. در هر صورت وقتیکه پویایی شناسی جمعیتشان مورد توجه قرار گیرد نتایج معلوم می نماید که این زیر جمعیتها ممکن است گروههای مدیریتی جداگانه یا ذخایر جداگانه ای را نشان دهند. هر چند تفاوت ژنتیکی شان کم باشد.

اردلان(۱۳۸۱) به مطالعه فیلوژنی *Panilarus homarus, P.poly phagus,Thenus orientalis, Scyllarides squammosus* از خرچنگهای دراز دریائی آبهای ایران با استفاده از روش PCR-RFLP پرداخت و بالا بودن میزان X^2 (X^2=۷۲) نشان دهنده آن دانست که این روش، روش مناسبی جهت جدا نمودن گونه های مختلف از یکدیگر می باشد و کلیه کلادو گرامهای حاصل از آنالیز داده های ریختی و مولکولی با روش Exhaustive تک نیائی بودن این گونه را تایید کرد.

محمدی (۱۳۸۱) با استفاده از مطالعات ریختی (مورفومتریک ومریستیک) و مولکولی به روش PCR-RFLP ساختار جمعیتی شاه میگوی دریای عمان (*Panilarus homarus*) در سواحل استانهای سیستان وبلوچستان مورد بررسی قرار دادند مطالعات مولکولی ناهمگنی ژنتیکی را بین مناطق مختلف نمونه برداری نشان نداد. مطالعات ریختی با نتایج حاصل از مطالعات مولکولی سازگار بود اگر چه از نظر ریختی به نظر می رسد که نمونه های مورد مطالعه هیبرید بین دو زیر گونه از گونه (*Panilarus homarus*) باشند. اما مطالعات مولکولی با مقایسه

هاپلوتیپ ها نشان داد که این نمونه ها دارای شباهت بیشتری به زیر گونه *Panilarus homarus mejasculpta* می باشد.

در امر معرفی نشانگر DNA هسته ای برای غربالگری میگوها با رشد متفاوت از طریق دستیابی به روش های دقیق و شناسایی شاخص های موثر در تولید آبزیان می تواند با انتخاب برترها و حذف افراد با ویژگی های نامطلوب و غیر اقتصادی، به برنامه اصلاح نژاد به منظور افزایش راندمان تولید کمک موثر نماید. و در بین روشهای متعددی که برای دستیابی این شاخص ها وجود دارد نشانگرهای DNA به دلیل کمتر متاثر از محیط شدن و قابلیت توارث به نسل های بعدی از جمله عواملی هستند که در بسیاری از آزمایشگاههای تحقیقات اصلاح نژاد به روشهای مولکولی به آنها توجه خاصی شده است. رکورد داده های تولید و محاسبه نرخ رشد می تواند از جمله شاخصهای پرورش یک گونه با شرایط برابر محیطی و تغذیه ای در طبقه بندی افراد یک گونه مورد استفاده قرار گیرد. در این تحقیق ابتدا افراد هم سن میگو که در استخر مشابه با غذای واحد تغذیه نموده اند در زمان برداشت از نظر طول و وزن و نرخ رشد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و به سه گروه با رشد بالا، متوسط و کم گروه بندی شدند. سپس با استفاده از روش RAPD از نظر ساختار ژنتیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند RezvaniGilkolaei (2010) و باند پلی مرفیسم ناشی از الکتروفورز محصول RAPD-PCR پس از قطع با اسکالپل از ژل آگارز رنگامیزی شده با اتیدیوم بروماید و خالص سازی باند DNA پلی مورف و کلون سازی و تعیین توالی کلون ها و طراحی پرایمرها برای تکثیر DNA سه گروه میگو به کار گرفته شد که به آن پرداخته خواهد شد.

از آنجا که در بررسی میگو به منظور اصلاح نژاد در مقایسه میگو ها با رشد کم، زیاد و متوسط باندهایی با وضوح بالا در میگو ها با رشد کم دیده شد که در دیگر میگوها موجود نبود، بنابراین در ادامه مطالعه ای با هدف تعیین مارکر اختصاصی برای میگوها با رشد کم انجام گرفت· بدین منظور توالی مورد نظر تعیین و سپس اقدام به طراحی پرایمر شد· بدیهی است این صفت رشد، جز مهمترین صفات اقتصادی است که دستیابی به مارکر این صفت می تواند مورد اقبال دست اندرکاران صنعت تکثیروپرورش قرارگیرد و به توسعه هرچه بیشتر این صنعت کمک نماید·

Garcia و Benzie (۱۹۹۵) در مطالعه امکان استفاده از مارکرRAPD ، در برنامه های اصلاح نژاد با استفاده از ۱۴ پرایمر RAPD فقط در یک خانواده از ۶ خانواده میگوی مونودون مورد بررسی دیده شد.همچنین با توجه به

ژنوتیپ والدین و مشاهده ژنوتیپ AA و Aa در نتاج مشخص می شود که مارکر پلی مورفیک رپید از توارث مندلی تبعیت کرده است و فقط در یک مورد عدم تبعیت از توارث مندلی را نشان داد (حضور باندی در فرزندان که در والدین وجود نداشت) که ان را به عدم خلوص DNA استخراجی به جهت مخلوط بودن DNA با DNA جمعیت باکتریایی و الگی موجود در محیط زندگی فرزندان (استخرهای سرباز) نسبت دادند.

Badaracco و همکاران در سال (۱۹۹۵) با استفاده از تکنیک RAPD ، ۱۴ جمعیت مختلف ارتمیای دو جنسی و پارتوژنیک در سه منطقه امریکا، مدیترانه و چین را از نظر روابط فیلوژنی مورد بررسی قرارداد، این محققین توانستند از بین ۸۶ پرایمر تصادفی مارکرهای شناسایی ۴ گونه ارتمیای دو جنسی (*A. persimilis and A. franciscana*) در امریکا ،A. salina در مدیترانه،A. species frome china در چین بدست اوردند.

روش RAPD توسط Tassankagon و همکاران (۱۹۹۵) برای تهیه نشانگر در میگوی *P.monodon* در تایلند مورد استفاده قرار گرفت . در این تحقیق ۲۰۰ اغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی تصادفی غربال گردید و در سه ناحیه جغرافیایی که مورد بررسی قرار گرفت موفق به پیدا کردن یک مارکر جهت شناسایی *P.monodon* شدند.

رضوانی گیل کلایی (۱۹۹۷) یک جفت پرایمر برای جداسازی انواع مختلف خاویار سیاه ماهیان خاویاری پیشنهاد نمود.

Gerg و همکاران (۱۹۹۷) در مارکرهای مایکروساتلایت اختصاصی در جمعیت و خانواده میگوی وانامی ۲۳ مارکراختصاصی جمعیت را در این گونه یافتند که ۲ تا از انها فقط در یکی از خانواده های جمعیت وانامی مکزیکو مشاهده شد.

Phongdara و همکاران (1999) با استفاده از روش RAPD-PCR توانستند دو گونه از میگوها به نام های *Penaeus merguiensis* و *Penaeus indicus* در تایلند را که به لحاظ مورفولوژیکی بسیار شبیه به هم هستند را با استفاده از مارکر مولکولی شناسایی کنند. در این تحقیق نهایتا هفت هاپلوتایپ بدست آمد که تایپ ۲-۱ فقط در گونه *P. indicus* و هاپلوتایپ ۵-۳ در *P. merguiensis* و هاپلوتایپ ۷-۶ در نمونه هایی که به لحاظ مورفولوژیکی شک برانگیز بودند مشاهده شد و احتمال هیبرید بودن آنها را مطرح کرد.

همچنین در مطالعه ای Moorad و همکاران (2001) مارکرهای مولکولی PAPD-PCR را به عنوان روشی سریع و قابل اعتماد در جهت شناسایی گونه های میگوها در مرحله سیستی معرفی کردند. پیش از این مطالعه بیشتر از

همان ویژگی های مورفولوژیکی و نهایتا هیبریدگیری برای تفکیک سیستها استفاده می شد. در تحقیق مذکور سیستهای میگوهای کالیفرنیا که با تفکیک آنها با استفاده از ویژگی های ریخت شناسی غیر ممکن و یا دشوار بودند، جهت مطالعات مولکولی انتخاب شدند. نتیجه مطالعات نشان داد که RAPD-PCR پتانسیل بالایی برای شناسایی گونه های میگو دارد.

بابائی (۱۳۸۰) به بررسی مولکولی سه گونه مهم میگوی دریای عمان و خلیج فارس*P.semisulcatus* و *P.indicns* و *P.merguensis* با استفاده از مولکول mtDNA به روش RFLP پرداخت . نتایج حاصله از این بررسی نشان دهنده متفاوت بودن پراکنش هاپلوتیپها در دو منطقه و تفاوت ذخایر این جمعیت با هم می باشد . ایشان آنزیم *Hinf*I را به عنوان مارکر مولکولی جهت تشخیص گونه های دیگر *Penaeus semisulcatus* و *P.indicns* و *P.merguensis* معرفی گردید.

در مطالعه حاضر به دنبال بررسی مارکر اختصاصی برای رشد مشاهده گردید که ژنوتیپ ۱۱۱۱۰ در گروه با رشد متوسط، ژنوتیپهای ۰۰۰۰۱۰۱۱۱۱،۱۰۱۱۱۱،۰۱۱۱۰ ،۰۰۱۱۱۱،۰۱۱۱۱۱،۱۱۱۱۱۰۱،۰۱۰۰۱۰۱۱ در گروه با رشد زیاد، ژنوتیپهای ۱۰۰۰۱ ،۱۱۰۰۱۱،۰۱۱۰۱۱،۰۰۱۱۱۱،۰۰۰۰۱۱۱۰۰،۰۱۱۱۱۱۱۰۰،۰۱۱۰۱۱۱۰۰، ۱۱۱۱۰۱، ۱۰۱۱۰۱، ۱۱۰۱۰۱۱ در گروه با رشد کم دیده شدند. ولی برای اینکه این مارکرها به عنوان مارکر اختصاصی در هر گروه مشخص شوند نیاز است که ازمایشات چندین بار با تعداد نمونه بیشتر، حداقل ۱۰۰ نمونه انجام گرفته و از طرفی ژنوتیپ های والدین نیز مشخص باشندGarcia و Benzie (۱۹۹۵) . مشاهده ژنوتیپ AA و Aa در نتاج مشخص می شود که مارکر پلی مورفیکRAPD از توارث مندلی تبعیت کرده است.

پیشنهادها

پیشنهاد می گردد که آزمایش در دو محیط تانک (شرایط کنترل شده) و استخر انجام شود تا تاثیر شرایط محیطی بر بهگزینی مشخص گردد.

پیشنهاد می گردد که آزمایش تا چند نسل تکرار شود

پیشنهاد می گردد که قبل از استفاده از این مارکر در مطالعات بعدی پلی مورفیسم این مارکر برای گونه مورد نظر مورد بررسی قرار گیرد.

پیشنهاد می گردد که آزمایش با استفاده از روشهای دیگر ژنتیکی ماننئ میکروساتلایتها انجام گیرد.

پیشنهاد می گردد که وراثت پذبری صفات دیگر مثل جنسیت ، ..... مورد بررسی قرار گیرد. پیشنهاد می گردد که وراثت پذبری برای گروههای سنی مورد بررسی قرار گیرد مثلا در هفته ۶ ام یا ۱۰ ام .

پیشنهاد می گردد که بعد از گروه بندی انجام گرفته (رشد متوسط، رشد بالا و رشد کم) ، امیزشی بین گروهای با رشد کم با هم ، رشد زیاد با هم و دو گرئه رشد بالا و کم باهم انجام گیرد و نتایج مورد بررسی قرار گیرد.

پیشنهاد می گردد به منظور تامین مولدین میگوی مورد نیاز و بالا بردن توان تولید مزارع ، یک مرکز تولید میگوی SPF و SPR در کشور ایجاد گردد.

منابع

۱. استانسفیلد، و . ۱۳۷۳. ژنتیک تئوری و مسائل آن . انتشارات فاطمی، ۶۹۳ ص

۲. اردلان،م.۱۳۸۱.مطالعه فیلوژنی گونه های لابستر ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد زیست شناسی، علوم جانوری(گرایش بیوسیستماتیک)،دانشکده علوم پایه،دانشگاه تهران، ۷۵ص

۳. افشار نسب ، م. ۱۳۸۶. تولید میگوی عاری از بیماریهای خاص Specific Pathogen Free (SPF) ، موسسه تحقیقات شیلات ایران

۴. افشار نسب ، م. ۱۳۸۶. ایمنی شناسی سخت پوستان با تاکید بر میگو و مکانیسمهای دفاعی در بیماری ویروسی لکه سفید(WSD)، موسسه تحقیقات شیلات ایران

۵. بابائی،م.۱۳۸۰. بررسی مولکولی سه گونه مهم میگوی دریای عمان و خلیج فارس*P.semisulcatus* و *P.indicus* و *P.merguensis* با استفاده از روش PCR-RFLP . پایان نامه دکتری دامپزشکی.دانشکده دامپزشکی دانشگاه ازاد اسلامی واحد کرج۷۵ ص

۶. رسولیان، ص.۱۳۷۹. بررسی روند ژنتیکی برخی صفات اقتصادی در مرغان بومی آذربایجان غربی، مرکز اموزش عالی امام خمینی (ره)، پایان نامه کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام

۷. سالنامه آماری شیلات، ۱۳۸۶.

۸. شرکت بازرگانی شیلات ایران، ۱۳۶۹. گزیده ای از بازار جهانی محصولات دریایی ، بخش تحقیقات و پژوهشهای بازرگانی شرکتت بازرگانی شیلات ایران – شماره A- 15، A- 16

۹. شرکت بازرگانی شیلات ایران، ۱۳۷۱. گزیده ای از بازار جهانی محصولات دریایی ، بخش تحقیقات و پژوهشهای بازرگانی شرکت بازرگانی شیلات ایران – شماره A- 22، A- 26

۱۰. صفری ، ر. ۱۳۸۶. انجماد اسپرم ، تکنولوژی نوین در صنعت شیلات . دومین همایش ملی بوم شناختی . گرگان

۱۱. عابدیان، ۱۳۸۶. جزوه کارشناسی ارشد تکثیر وپرورش ابزیان تکمیلی دانشگاه تربیت مدرس

۱۲. قرایی،ا.۱۳۸۰.تشخیص مولکولی گونه تاسماهی ایران و تاسماهی روس با استفاده ازروش RAPD پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات . دانشکده منابع طبیعی،دانشگاه تهران،۸۱ ص

۱۳. محمدی کاشانی،ق. ۱۳۸۱.مطاله جمعیتی شاه میگو گونه *Panilarus homorus*با استفاده از انالیزهای عددی ومولکولی. پایان نامه کارشناسی ارشد زیست شناسی، علوم جانوری(گرایش بیوسیستماتیک)،دانشکده علوم پایه،دانشگاه تهران، ۷۰ ص

۱۴. متین فر، ۱۳۸۶. برنامه راهبردی میگو ، موسسه تحقیقات شیلات ایران ،۱۵۲ ص

۱۵. مجیدی نسب، ۱. ۱۳۷۷. بیماریهای میگوهای پرورشی، ۲۰۸ ص

۱۶. نوربخش، ح. ۳۷۰ . پژوهشی پیرامون صید دریا دریا و آبزیان خلیج فارس، موسسه انتشارات امیرکبیر- تهران .

۱۷. هالرمن، ا.۱۳۸۴.اصول وروشهای مطالعات ژنتیکی ماهیان(جلد اول)،ترجمه ایرج هاشم زاده سقرلو، انتشارات نقش مهر.تهران

۱۸. هالرمن، ا.۱۳۸۴.کاربرد ژنتیک جمعیت در شیلات(جلد دوم)،ترجمه ایرج هاشم زاده سقرلو، انتشارات نقش مهر.تهران

19. Amato, D.M.E and Corch, D., 1996. Genetic diversity of population of freshwater shrimp (*Macrobrachium borelli*) : (Caridae: palemonidae) evaluated by RAPD analysis. j. Crust. Biol., 16(2):650-655
20. AQUACOP, Ledu, C., Diter, A., 1993. Induction pf polyploidy nauplii in *Penaeus indicus*. Aquaculture, 111. 315(Abstract)
21. Argue, B. J., Arce, S. M., Lotz, J. M. and Moss, S. M. 2002. Selecive breeding of pacific white shrimp (litopenaeus vannamei) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. Aquaculture. 204. 447-460
22. Arenal, A., Pimentel, R., Garcia, G., Pimentel, E and Alestrom, P.2004. The SV40 T antigennuclear localization sequence enhances nuclear import of vectore DNA in embryos of a crustacean (*Litopenaeus schmitti*) .Gene.337:71-77
23. Alcivar-Warren, A., Garcia, D.K., Faggart, M.A. and Rich , C., 1994. Evaluation of genetic diversity in Penaeus vannamei shrimp stocks using molecular genetic techniques. USMSFP(US Marine Shrimp Farming Program) 10th Anniversary Review, GCRL Special Publication No. 1., PP. 27-34
24. Bachere, E., Mialhe, E., Noel, D., Boulo, V., Morvan, A., Rodrigue, Crustacean immunology. Aquaculture. 132. (1-2), 17-32
25. Badaracco, G., Bellorini, M., Londesberg, M., 1995. phylogenetic study of biosexual artemia using renelom amplified polymorphic DNA. J. Mol. Evol., 41(2):150-154
26. Beaumonet, A. R., Kelly, K.S., 1989. Production and growth of triploid *Mytilus edilus* larvae. Journal of Eprimental Marine Biology and Ecology. 132.69-84
27. Bebtsen, H. B and Olesen, I. 2002. Designing aquaculture mass selection programs to avoid high inbreeding rates, Aquaculture 204. 349-359 Benzie, J.A.J., Kenway, M., Ballment, E., Frusher, S., Trott, L., 1995. Interspecific hybridization of the tiger prawns *penaeus monodon* and *penaeus esculentus*. Aquaculture.133.p: 103-111
28. Benzie, J.A. H.1998. Penaeid genetic and biotechnology.Aquaculture. 164:23-47
29. Benzie, J.A.J., Kenway, M., Trott, L. 1997. Estimates for the hertability of size in juvenile *penaeus monodon* prawn from half-sib matings. Aquaculture.152.p: 49-53
30. Benzie, J. A. H. 2009. Use and exchange of genetic resources of penaeid shrimps for food and aquaculture. Reviews in Aquaculture 1: 232–250
31. Bierne, N., Beuzart, I., Vonau, V., Bonhomme, F., Bedei, E, 2000. Microsatellite-associated heterosis in hatchary-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. Aquaculture. 184. 203-219

32. Bondari, K., Dunham, R.A., 1987. Effect of inbreeding on economic traits of channel catfish.Theor. Appli.Genet. 74. 1-9
33. Bray, W.A., Lawrence, A.,L., Lester, L., Smith, L.L.1990. Hybridization of *Penaeus setiferus* (Linnaeus 1767) and *Penaeus schimitti* Birkenroad 1936(Decapoda). J. Crust. Biol., 10:. 278-283
34. Browdy, C. L. 1998. Recent developments in penaeid broodstock and seed production technologies: improving the outlook for surperior captive stock. Aquaculture 164:1-4. p: 3-21
35. Campos, G., Montaldo1, H., Arechavaleta-Velasco, M. and Castillo-Ju?rez, H. 2006. Heritability of body length at 25 days of age in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13-18. Belo Horizonte, MG, Brasil.
36. Carpenter, N., Brock, J.A. 1992.Growth and survival of virus-infected and SPF penaeus vannamei on a shrimp farm in Hawaii. Hawaii, USA, 289-293
37. Chourrout, D. 1984. Pressure induced retention of 2nd polar body and suppression of 1st cleavage in rainbow trout production of all triploids all tetraploids and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. Aquaculture, 36: 111-126.
38. Cherfas, N. B., B. Gomelsky, N. Ben-Dom, and G. Hulata. 1994. Assessment of triploid common crap (*Cyprinus carpia* L.) for culture. Aquaculture 127: 11-18.
39. Carr, W. H., Fjalestad, K.T., Godin, D.M., Swingle, J., Sweeney, J.N., Gjedrem, T., 1997.Genetic variation in weight and servival in population of specific patogen free shrimp . *Penaeus vannamei*. In:Book of Abstracts. World Aquaculture, Bangkok, Thailand, 1997, p.63
40. Chourrout, D., Chevasus, B., Krieg, F., Happe, A., Burger, G., Renard, P., 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females. Potential of tetraploid fish. Theoritical and Applied Genetic . 72(2), 193-206
41. Chow, S and Sandifer, P.A., 1991. Differences in growth, morphometeric traits and male sexual maturity among pacific white shrimp. Penaeus vannamei, from different commercial hatchares. Aquaculture. 92. 165-178
42. Crocos, P., Davis, G., Preson, N. and Keys, S. 2002.Comparative growth, servival and reproductive performance of inbred and outbred lines of domesticated shrimp, *Penaeus japonicus*, In Australia, Aquaculture. 204.p. 198
43. Davis, G.P., Hetzel.,2000. Intgrating molecular genetic technology withtraditional approaches for genetic improvement in aquaculture species, Aquaculture Research.31:3-10
44. Die, J., Zhang, Q. and Bao, Z., 1989., Karyotype studies on *Penaeus orientalis*. J. Ocean. Univ. Qingdao 19, pp.97-103
45. Donato, M. D., Manrique, R., Ramirez, R., Mayer, L. and Howell, C.2005. Mass selection and inbreeding effect on a cultivated strain of penaeus(Litopenaeus) vannamei in venezuela.Aquaculture. 1-4: 159-167
46. Dong, Z., Zhon, E., 1998. Application of random amplified polymorphic DNA technique in a study of heterosis in common carp (*Cyprino carpio L.*) Aquaculture Research 26(8):698-700
47. Dawley, R. M. 1991. An introduction to unisexual vertebrates. In Evolution and Ecology of unisexual vertebrates (Dawley, R. M. and Bogart, J. P. eds), New York State Museum Bulletin 466, 1-18.
48. Eknath, A.E.,Tayamen, M.M , Palada de Vera, M.S., Danting. J.C., Reyes, R.A.,Dionissio, E.E., Capili, J. B., Bolivar, H. L.Abeiia, T. A., Circa, A.V., Bensten, H. B., Gjerde, B., Gjedrem, T., Pullin. R. S. V.1993. Genetic improvement of farmed Tilapia: The performance of eight strains of *Orechromis niloticus* tested in differnted farm environments. Aquaculture. 111. 171-188
49. Falconer, D. S.1998. Introduction to Quantitative Genetics. 3Th Edition. Longman Scientific& Technical. 438p
50. FAO, 1985. Statis of the shrimp and resources of Persian Gulf, No:668.
51. Foolad, M. R., Chard. R.Junes, A. and Raymond, Z. R. 1993. RAPD marker for constracting interspecific tomato genetic maps plant cell report. 3: 40-44
52. Garcia, D. K., Benzie, J.A. H. 1995. RAPD markers of potential use in penaeid prawn *(Penaeus monodon)* breeding programs. Aquaculture. 130. p:137-144
53. Gendreau, S., Delecheneau, J.M., Cadoret, J.P., Miaalhe, E., 1991. Methodology for microinjection of embroys of the shrimp *Penaeus indicus*. Europian Aquaculture Society Special Poblication, No.14. pp.115-116(abstract)
54. Gendreau, S., Lardans, V., J.M., Cadoret, J.P., Miaalhe, E., 1991.. Transient expression of a luciferase reporter gene after ballistic introduction into *Artemia franciscana* (Crustacea) embroys. Aquaculture. In press.
55. Greg M. Wolfus, Denise K. Garcia and Acacia Alcivar-Warren. 1997. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. Aquaculture. 152:35-47.

56. Gitterle, T., Rye, M., Salte, R., Cock, J., Johansen, H. and Lozano, C. 2005. Genetic (co)variation in harvest body weight and survival in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* under standard commercial conditions. Aquaculture 243: 83–92.
57. Gjedrem, T., Fimland, E., 1995. Potential benefitts from high health and genetically improved shrimp stocks. In Browdy, C. L., Hopkins, J.S.,(Eds.). Proceedings of Special Session on Shrimp Farming SwimingThriugh Troubled Water. Aquaculture 95:235
58. Gjerede, B., Gunnes, K., Gjedrem, T., 1983. Effect of inbreeding on servival and growth in rainbow trout. Aquaculture. 34. 327-332
59. Glinski, Z., Jarose, J., 1997. Molluscan immune defence. Archiuvum Immunologiate et Therapiae Exprimentalis. 45. 149-155.
60. Gold, J.R., LI.,Y.C. Shipley, N. S and Powers, K. 1990. Improced methods for working with fish choromosomes with a review of metaphase chromosome banding. Journal of Fish Biology 37:563-575
61. Goyard, E., Patrois, J. M.,Peignon, V., Vanaa, R., Dufour, J., Viallon and Bedier, E., 2002. Selection for better growth of *Penaeus stylirostris* in Tahiti and Caledonia. Aquaculture. 204. 461-468
62. Guo, X., Allen., S.k., 1994. viable tetraploid in the pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 3, 42-50
63. Guo, X., DeBrosse, G., Allen, S.K., 1996. All triploid Pacific oysters (*Crassosstrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploid and diploid s. Aquaculture. 142. 149-161
64. Herding, C. G., Kenchington, L.E., Bird , J. C and Pezzack, S.D., 1997. Genetic relationship among
65. Hayashi, K.and Fujiwara, Y., 1988., A new method for obtaining metaphase choromosome from the regeneration blastema of *Penaeus* (marsupenaeus) *japonicus*. Nippon SuisanGakkaishi 54, PP. 1563-1565
66. Hetzel, D.J. S., Crocos, P. J., Davis, G.P.,Moore and Preston, N.C.2000. Response to selection and hertability for growth in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture.181. 215-223.
67. Hedgecock, D., Tracey, M. L. and Nelson, K.,1982. Genetics. In: L.G.Abele(Editor), The biology of Crustacea. AcademicPress, New York, pp:284-40
68. Hillis, D. M., C. Moritz and B. Mable. 1996. Molecular systematics, Second edition. Sinauer Assoc., Inc. Sunderland, MA 655 pp.
69. Hoa, N.D. 2009. Domestication of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in recirculation systems in Vietnam. PhD thesis, GhentUniversity, Belgium.179P.
70. Hovarth, L., Orban, L., 1995. Genom and gene manipulation in common carp. Aquaculture. 129. 157-181
71. Huayyong, A., Allen, S.K., 2002. Hybridization of tetraploid and diploid (*Crassosstrea gigas* Thunberg) with diploid *c. ariakensis* (Fujita). Journal of shell fish Research.21(1), 137-143
72. Jaenike, F., Gregg, K and Hamper, L.,1993. Shrimp production in texas using Specific Pathogen Free Stocks. Texas, USA, 296-302 Janzen, F. J., 1992. Heritable variation for sex ratio under environmental sex determination in common snapping turtle (*Chelydra serpentine*) . Genetics 131. 155-161
73. Joseph L. Badaracco, Jr., and Allen P. Webb. 1995. "Business Ethics: A View from the Trenches," California Management Review: 8-28.
74. Karpelainen, H., 1990. Sex ratio and conditions required for invironment sex determination in animal. Bio. Rev. 65.pp. 147-184
75. Kazan, K., Manners, J.M. and Cameron, D. F., 1993. Genetic Relationships andvariation in the *Brylosanthes quinanensis* Species complex assessed by randomly amplified polymorphic DNA. Genome, 36:43-49
76. Keys, S. J.,Crocos, p. ., Burridge, C.y., Coman, G.J., Davis, G. P. and Preston, N. P.2004.Comparative growth and survival of inbred and outbred *Penaeus(marsupenaeus)japonicus*, reared controlled environment conditios: indications of inbreeding depression.Aquaculture. 241.p:151-168
77. Kamadar, P.G., Von Allen, G. , Finnerty, V., 1992. Transient expresion of DNA in *Drosophila* via electroporation.Nucleic Acids Research. 20. 3526.
78. Kincaid, H., 1983. Inbreeding in fish population used for aquaculture.33.215-227
79. Komen, J., Bongers, A. B. J., Richter, C.J. J., Van Muiswinkel, W. B. B. and Hiusman, E. A. 1991. Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio*) II: the production of homozygous clones and F1 hybrids. Aquaculture, 92: 127-142.
80. Legrand, J.J., Legrand-Hamelin, E. and Jachault, P., 1987. Sex determination in crustacea. Bio.Rev. 62. pp.439-470
81. Lasley, J.F., Genetics of Livestock Improvement . 4th edn. Prentice-Hall, Englewood Cliffs. NJ, USA.

82. Lester, L.J. 1983. Developing a selective breeding program for penaeid shrimp mariculture. Aquaculture33. pp:41-50 Lester, L.J ., Lawson, K. S., Abella, T. A.,Palada, M.S.1989. Estimated heritability of sex ratio and sexual dimorphism in tilapia. Aquat. Anim. Health 10. 271-281
83. Lester, L.J and Lawson, K. S., 1990. Inhertance of size as stimated by principal component analysis at two tempratures in *Penaeus vannamei*. Aquaculture.83.p:323-323 Li, Z., Li. J, Wang. Q., He, Y., Liu, P.,2006. The effect of selective breeding on the genetic structure of shrimp *Fenneropenaeus chinensis* populations. Aquaculture. 258: 278-282
84. Lightner, D.V., Poulos, B.T., Bruce, l., Redman, R. M., Mari, J. 1991. New development in penaeid virology: Application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas. University of Arizona, Tucson. 235-253
85. Lightner, D. V. 2003. Exciusion or specific patogens for disease prevention in a penaeid shrimp biosecurity program. The world Aquaculture Society.Pp:81-116
86. Lotz, J. M.1992.Developing Specific Pathogen –Free (SPF) Animal Population for Aquaculture:A case Study for IHHN of Penaeid Shrimp. Gulf Coast Research Laboratory. USA. 269-283
87. Liu, S., Liu, Y., Zhou, G., Zhang, X., Luo, C., Feng, H., He, X., Z hu, G., Yang, H., 2001.The formation of tetraploid stocks of red crucian carp * common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization . Aquaculture192.171-186
88. Lu, Y., Sun, P.S., 2005.Virual resistance in shrimp that express an antisense Taura syndrome virus coat protein gene. Aquaculture. 67:141-146
89. Mazur, P., Cole, KW, Hall, Schruders, PD., Mohwald, AP. 1992. Cryobiological preservation of Drosophila embroys. Science. 258: 1932-1935
90. Meryman, HT.1971. Crypreservation agent. Cryobiol 8:173-183
91. Moss, D. R., Arce, S. M., Otoshi, C. A., Doyle, R. W., Moss, Sh. M. 2007. Effect of inbreeding on servival and growth of Pacific white shrimp *Penaeus(litopanaeus)vannamei.*Aquaculture. 30-37
92. Moorad, J.A., Simovich, M.A., Mayer, M.S. 2001. Identification of southern Californian Branchinecitid cysts (Crustacea, Anostraca) using RAPD-PCR species specific markers. Transactions of the western section of the wildlife society.37: 16-21.
93. Moore, S.S ., Whan, V., Davis, G. P., Byrne, K., Hetzel, D. J.S. and Preston, N., 1999. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Aquaculture173, 19-32
94. Muller, F., Lele, Z., Varadi, L., Menezel, L., Orban, L., 1993. Efficient transient expression system based on squre pulse electroporation and in vivo luciferase assay of fertilised fish eggs. FEBS Lett. 324. 27-32
95. Nagy K., Rajki L., Horvath L. and CsanyV. 1978. Investigation on carp (*Cyprinus carpio L.*) *gynogenesis. Journal of Fish Biology*13, 215-224.
96. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist. 106: 283-292.
97. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583-590
98. Nelson, K. and Hedgecock, D., 1980. Enzyme polymorphism and adaptive strategy in the decapod Crustacea.Am. Nat., 116:238-280
99. Naylor, R.L., Goldburg, R. J., Primavera, J.H., Kausky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000.
100. Effect of aquaculture on wild fish supplies. Nature 405. 1017-1024 Pante, M.J.R., Gjerede, B., Mcmillan, I., 2001. Effect of inbreeding on body weight at harvest in rainbowtrout, *oncorhynchus mykiss.* Aquaculture. 192. 201-211
101. Pantoja, C.R., Song, X., Xia, L., Gong, H., Wilkenfeld, J., Noble, B and Lightner D.V.2005. Development of a specific pathogen-free (SPF) population of the chinese fleshy prawn *Fenneropenaeus chinensis* . Part 1: Disease Pre- screening and Primery Quarantine. Aquaculture. 250. p:573-578
102. Pherson MM, Moller S. Moller SG. 2000. PCR (Basic: from background to bench). BIOS Scientific Publishers Ltd.
103. Phongdara, A., Chotigeat, W., Chandumpai, A., Chanpa, T. and Duangtong, P. 1999. Identification of Penaeus merguiensis andPenaeus indicus by RAPD-PCR Derived DNA Markers. Science Asia. 25:143-151.
104. Purdom, C. E. 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. Aquaculture 33:287-300.
105. Philips, R. B., and Read, K.. M.1996. Application of fluorescence in situ,hybridization (FISH) to fish genetics. Aquaculture 140. 197-216
106. Phillips, R. L.,Vasil, I. K.(2001) DNA-Based Markers in Plants. 2nd. Edition. Kluwer Academic Publishers.

107. Pourkazemi, M.1996. Molcular and Biochemical Genetc Analysis of sturgeon stocks from the south Caspian Sea .Ph.D Thesis.260 pp.School of Biological sciences,university of Wales,Swan Sea
108. Powers, D.A., Kirby, V.L., Cole, T., Herefored, L., 1995. Electroporation as an effective means of introducing DNA into abalone (*Hliotis rufescens*) emroys. Mol. Mar.Biol.Biotechnology. 4.369-376
109. Preston, N.,Atkinson, P., 1995. The use of green fluoresent protein to asess the successful of DNA delivery into prawn embroys. First Internatinal Workshop on Transgenesis of Invertebrates. Montpellier, France, Aprill1995., p.2. (abstract)
110. Preston, N. P., Baule, V.J., Leopold, R. Henderling, J., Atikinston , P.W. and Whyard, S .2000. Delivery of DNA to early embroys of kuruma prawn, *Penaeus japonicus.* Aquaculture . 181. 225-234
111. Preston, N.P., Croscos, P.J. and Keys, S.2002. Improving the growth rates of farm stocks of *Penaeus japonicus* through selective breeding, Aquaculture. 204. p.239
112. Preston, N.P., Croscos, P.J. and Keys, S. J., Coman, G. J., Koenig, R.2004. Comparitive growth of selected and non-selected Kuruma shrimp *Penaeus(Marsupenaeus) japonicus* in commercial farm ponds; implications for broodstock production. Aquaculture. Pp: 73-82 Perez-Rostro , C.I., Ramirez, J.L and Ibarra, A.M. 1999. Maternal and cage effect on genetic parameter estimation for Pacific white shrimp *Penaeus(litopanaeus)vannamei*Boone.Aquaculture Research. 30.Pp:191-197
113. Perez-Rostro, C.I., Ibarra, A. M. 2003. Quantitative genetic parameter estimates for size and growth rate traits in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* (Boone 1931) when reared indoors. Aquaculture Research 34: 543–553
114. Rezvani Gilkolaee, S., Safari, R., Lalooei, F. and. Taqavi, M.J. 2010. Using RAPD markers potential to identify heritability for growth in *Fenneropenaeus indicus.*Iranian Journal of Fisheries Sciences. (Un published)
115. Rosenberg, P., 1998. Peenaeid and ecology- a reviw . Aquaculture164. pp. 49-65.
116. Rudolph, AS., Crowe, JH. 1985. Membrane stabilisition during freezing.: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. Cryobiol. 22: 367-377
117. Sarder, M. R. I, Penman, D. J., Myers, J. M. and McAndrew, B. J. 1999. Production and propagation of fully inbred clonal lines in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) J. Exp. Zool. 284: 675-685.
118. Sagi, A., Cohen, D., 1990. Growth , maturation and progeny of sex-reversed *Macrobrachium rosenbergii* males. World Aquacult. 21(4), 87-90
119. Sellars, M.J., Degnan, B.M. and Preston, N. P.2006. Production of triploid Kuruma shrimp, *Marsupenaeus* (Penaeus) *japonicus* (Bate) nauplii through inhibition of polar body I, or polar body I and II extrusion using 6-dimethylaminopurine. Aquaculture, 256. 337-345
120. Sellars, M.J., Coman, F. E., Degnan, B.M. and Preston, N. P.2006. The effectiveness of heat, cold and 6-Dimethyleaminopurine shocks for inducing tetraploidy in the Kuruma shrimp, *Marsupenaeus* (Penaeus) *japonicus* . Journal of Shellfish Research, 25.(2)631-637
121. Stanly, J.G., Hidu, H., Allen, S.K., 1984. Growth of American oyster increased by polyploidy induced by blocking meiotic I but not meiosis II. Aquaculture. 37. 147-155
122. Subramoniam, T., 1994. Cryoprreservation of crustacean gametes and embroys. Proceeding Indian National Science Academy. 60.3:229-236 Subramoniam, T., Newoton, SS.1993. Cryoprreservation of the embryos of the penaeid prawn *Penaeus indicus*. Current Sience. 65: 176-177 Tasankagon, A., Pongsom boon, S., Rimphanitachayakit, V., Jarayabhand, P., and Boonseeng, V.,1995.Random Amplified Polymorphic DNA marker for determination of genetic variation in wild population of blak tiger prawn(P*enaeus monodon*) in thiland. Mol. Bio. Biotech., 8:110-115
123. Wang, Z., Guo, X., Allen, S.K., Wang, R., 2002. Hererozigosity and body size in triploid pacific oyster, (*Crassosstrea gigas* Thunberg) produced from meiosis II inhibition and tetraploids.Aquaculture. 204.(3-4), 337-348
124. West neat, D.F., and Webster, M.S., 1999. Molecular analysis of kinship in birds: interesting questions and useful techniques. In:B. Schier water, B. Steit, co. p.wagner and R. De salle (eds).
125. Welsh, J.,Meclelland ,M.1990. Finger printing genomic using PCR with arbitary primers.Nucleic Acids Research.12:7212-7213
126. Whittingham, DG, Leibo, SP., Mazur, P., 1972. Survival of mouse embryous frozen to -196c̊ and -269c̊. SCIENCE178:414
127. Williams, J.G.K.,Kubelik, A., Livak, K.,Rasfolshki, J. A.,Tingey, S.V.1999. DNA polymorphism amplified by arbitary primers are useful and genetic markers.Nucleic Acid Res.18:6531-6535
128. Wolfus, G. M., Garcia, D. k and Alcivar-Warren, A.A. 1997. Application of the microsatellite technique for analysing genetic diversity in shrimp breeding programs., Aquaculture. 152. 35-47
129. Wyban, J.A.2007. Thailand's shrimp revolution.AQUA Culture AsiaPacific Magazine.May/ June16-18

130. Wyban, A. J. 1992. Selective Breeding of Specific Pathogen- Free (SPF) Shrimp for High Health and Increased Growth. Howaii, 257-268
131. Xiang, j., 2001.Recent advance of research and development on marine biotechnology in china. In: Postgrauate conference on marine biology and biotechnology, june 6-8, Hong kong, china, p.12
132. Xiang, j., Zhou, L., Zhang, F. 2001. Triploid induction in penaeidae shrimps with special reference to a new chemical inducing reagent 6-DMAP(6-dimethylaminopurine). Aquaculture2001. Book of Abstract. P.705
133. Xiang, j., L. Fuhua, Zhang, CH, Zhang, X., Yu, K., Z, L. and Wu, Ch. 2006. Evaluation of induced triploid shrimp *penaeus* (fenneropenaeus) *chinensis* cultured under laboratory conditions.Aquaculture Research.37(12)pp:1180-1186
134. You, Z., Nadala, E.C.B., Yang, J., Loh, P.C., 2004. The current development of technologies for shrimp viruses diagnosis/ detection. Current Top. Virol. 4, 63-73

پیوست

ساخت بافرها (منبع LAB FUQS)

SDS ۲۰ درصد (سدیم دودسیل سولفات)

مواد مورد استفاده : SDS ، HCL و آب مقطر

طرز تهیه : مقدار ۱۰۰ گرم کریستال SDS در ۴۵۰ میلی لیتر آب مقطر در دمایc°۶۸ حل گردید. با اضافه کردن pH , HCl را به ۷/۲ رسانده و سپس حجم این محلول را به ۵۰۰ میلی لیتررسانده شد. این محصول در دمای آزمایشگاه نگهداری گردید.

بافر TAE

موارد مورد استفاده :Tris , NaEDAT واسید استیک گلاسیال

طرز تهیه : مقدار ۴۸/۴ گرم تریس در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید ، سپس ۲۰ میلی لیترNa_2 EDTA نیم مولار و ۱۱/۴۲ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال به بافر اضافه شد. حجم محلول با استفاده از آب مقطر به یک لیتر رسانده و در دمای اتاق نگهداری گردید .

بافر سنگین کننده (Loading buffer)

مواد مورد استفاده : برموفنل بلو ۱٪ ،زایلن سیالین۱٪ ، گلیسرول ۵۰٪، تریس.

طرز تهیه : مقدار۲۵۰ گرم برموفنل بلو با ۲۵۰ گرم زایلن سیالین را در ۳۳ میلی لیتر تریس ۱۵۰ میلی مولار با pH =۷,۶ حل نموده و پس از آن مقدار ۶۰ میلی لیتر از ماده گلیسرول ومقدار ۷ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده و محلول فوق در دمای آزمایشگاه نگهداری گردید.

آمونیوم پر سولفات(A.P.S)

مواد مورد استفاده : پودر آمونیوم پر سولفات ،آب مقطر

طرز تهیه : ۱۰ گرم پودر آمونیوم پر سولفات را در ۷۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و در نهایت حجم محلول را با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و در دمایc°۴ نگهداری می شود.

:TEMED

این ماده به صورت محلول بوده و فوق العاده سمی است و این ماده دارای خاصیت کاتالیزوری جهت تسریع پلیمریزه شدن ژل اکریل آمید است.

اکریل آمید ۳۰ درصد

مواد مورد استفاده : اکریل آمید ، متیلن بیس اکریل آمید ،آب مقطر

طرز تهیه : ۲۴ گرم اکریل آمید به همراه یک گرم متیلن بیس اکریل آمید(N,N methylen bis acrylomid) در ۷۰ لیتر آب مقطر به ۱۰۰ سی سی رسانده می شودو در دمای ۴ درجه نگهداری می شود.

۱۰(x)TBE

مواد مورد استفاده : تریس ، اسید بوریک ، EDTA نیم مولار و آب مقطر

طرز تهیه : برای تهیه یک لیتر(x)TBE ۱۰، ۱۰۸ گرم تریس باز به همراه ۵۵ گرم اسید بوریک (۴۰ میلی لیتر EDTA نیم مولار (pH = ۸)مخلوط نموده و حجم نهایی به وسیله آب مقطر دوبار تقطیر به یک لیتر رسانده می شود.

STE

مواد مورد استفاده: تریس۰/۰۵ مولار ، EDTA ۰/۰۱ مولار، NACL ۰,۱ مولار

طرز تهیه : برای تهیه یک لیتر S TE گرم تریس ۰/۰۵ مولار و گرم EDTA ۰/۰۱ مولار و گرم NaCl ۰/۱ مولار را در ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر حل نموده و pH را به ۸ رسانده و حجم نهایی به یک لیتر افزایش داده میشود.

فنل کالیبره

مواد مورد استفاده :فنل کریستالی ، ۸ـ هیدروکسی کوئینولین ، تریس ، آب مقطر

روش آماده سازی

۱-مقدار ۵۰۰ گرم فنل کریستالی را در حمام آبی با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده تا ذوب شود.

۲- میزان ۰/۱درصد حجم فنل آنتی اکسیدان ۸ ـ هیدروکسی کونئولین به آن اضافه می شود (۰,۱گرم به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر) این ماده رنگ زرد به فنل می دهد .

۳ـ ۵۰۰ میلی لیتر ۰/۵ M Tris _ HCl با ۸ =pH به محلول اضافه می شود .

۴ـ بااستفاده از دستگاه همزن به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت پایین هم زده می شود .

۵ـ محلول را در دمای اتاق ساده قرار داده تا دو فاز آبی و آلی آن از هم جدا شود به آرامی فاز بالایی را با پسیپت جدا کرده و در ظرف پیمانه فنل ریخته شود .

۶ـ ۵۰۰ میلی لیتر ۰/۵M Tris-HCl با (۸ =pH) به فاز پائینی (آلی) اضافه می گردد . سپس مراحل چهارم و پنجم تکرار می گردد . تا اینکه pH محلول به حدود ۸ برسد.

۷ـ در نهایت ۲۵۰ میلی لیتر ۰/۵ M Tris-HCl (۸ =pH) با بافر TE (۸ =pH) به فنل اضافه می شود ودر بطریهای شیشه‌ای تیره دریخچال دردمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری میشود. برای جلوگیری از سوختگی و آسیبهای فنل ، تمام مراحل کار زیر هود شیمیایی انجام می شود و در حین کار از دستکش ، عینک محافظ و ماسک استفاده می شود ضمنا تمام مواد پسمان فنل و وسایل یکبار مصرف آلوده به فنل باید طبق مقررات آزمایشگاهی به طور جداگانه دفع شود.

Abstract

Sampling was done using 90 post larve which were produced by reproduction of some broodstock of *Peneaus indicus* in one day and reared in the same situation for 4 month. Samples were classified in 3 group high growth, medium and low (according to their weight and length). Genomic DNA was extracted from a 1cm ^{2} piece of muscle using the phenol-chloroform method. . The polymerase chain reaction (PCR) was done using 21 RAPD loci. and PCR products were separated on 3% Agarose gels. From 21 studied loci, 12 produced polymorphic bands. The most polymorphic band produced using OPAQ 9 and the least by OPAQ 7. According to Nei 1972, the highest distance (0.457) was between low growth group and medium and the lowest (0.091) between high growth group and medium, therefore the highest identity (0.912) was between high growth group and medium and the lowest (0.633) between low growth group and medium. Consensus neighbour-joining tree using Nei (1972 and 1978) resulted in two clades, the first including high and medium growth groups and the second low growth group, it appears that low growth group are depended on separated population of the two others. With considering of mean weight of F_1(16.25±1.5), mean weight of 15 ±1.2 and mean weight of parent 31.6, response to selection (R) and heritability for growth in this species were estimated 1.2±0.2 and 0.07±0.01 respectively. In another part of this study Sequencing of specific bands and primer design were done and examining of them on the same age specimens is necessary in following .

Keywords: *Peneaus indicus,* high growth, RAPD marker, Iran

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – Persian Gulf & Oman Sea Ecology Research Center- South Aquaculture Research Center- Iran Shrimp Research Center

---

Title Genetic National Plan Study in order to Shrimp breeding and developing of Shrimp Culture Technology
Apprpved Number: 20976
Author: Sohrab Rezvani Gilkolaei
Executor *:* Sohrab Rezvani Gilkolaei
Collaborator : M. Banafi., F. Laloei., M.J.Taqavi., A. Matin far., R. Safari
Advisor(s): -
Location of execution : Hormozgan , Khouzestan & Bushehr provinces
Date of Beginning : 2007
Period of execution :2 Years
Publisher : ***Iranian Fisheries Research Organization***
Circulation : ***20***
Date of publishing : ***2011***
All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE

AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION

IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION- Persian Gulf & Oman Sea Ecology Research Center- South Aquaculture Research Center- Iran Shrimp Research Center

Title:

Genetic National Plan Study in order to Shrimp breeding and developing of Shrimp Culture Technology

Executor :

Sohrab Rezvani GilKolaei

Registration Number

2011.1489