

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - پژوهشکده میگوی کشور

عنوان:

**بررسی تفاوت‌های ژنتیکی موجود در  
میگوهای سفید غربی نسل‌های مختلف**

مجری:

محمدخلیل پذیر، محمدمهدی سیمرونی

شماره ثبت

۵۱۰۹۶

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - پژوهشکده میگوی کشور

عنوان پروژه: بررسی تفاوت‌های ژنتیکی موجود در میگوهای سفید غربی نسلهای مختلف

شماره مصوب پروژه: ۹۳۰۰۱-۹۳۵۲-۱۲۵۲-۸۰-۱۳۴

نام و نام خانوادگی نگارنده/نگارندگان: محمد خلیل پذیر

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه‌ها و طرح‌های ملی و مشترک دارد): -

نام و نام خانوادگی مجری/مجریان: محمد خلیل پذیر (مجری موسسه)، محمد مهدی سیمرونی (مجری

دامپزشکی بوشهر)

نام و نام خانوادگی همکار(ان): بابک قائدنیا، محمد پورکاظمی، خسرو آئین جمشید، عباس متین فر، محمد

افشارنسب، قاسم غربی، سید ابراهیم صفوی، عباسعلی زنده‌بودی، مرتضی بحرانی، زینب نوروزی، هادی

رضایی، محمود شمالی

نام و نام خانوادگی مشاور(ان): سید احمد قاسمی

نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -

محل اجرا: استان بوشهر

تاریخ شروع: ۹۳/۳/۲

مدت اجرا: ۲ سال

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال ۱۳۹۶

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

بلامانع است.

**«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»**

پروژه : بررسی تفاوت‌های ژنتیکی موجود در میگوهای سفید غربی  
نسل‌های مختلف

کد مصوب : ۹۳۰۰۱-۹۳۵۲-۱۲۵۲-۸۰-۱۳۴

شماره ثبت (فروست) : ۵۱۰۹۶ تاریخ : ۹۵/۱۱/۲

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محمدخلیل پذیر دارای مدرک  
تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بهداشت و بیماری‌های آبزیان  
می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان در

تاریخ ۹۵/۸/۱۸ مورد ارزیابی و با رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده میگوی کشور مشغول بوده

است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده	.....	۱
۱-مقدمه	.....	۲
۲-مواد و روش کار	.....	۷
۲-۱-تعیین تاریخچه واردات مولدین میگوی سفید غربی به کشور	.....	۷
۲-۲-تعیین شاخص های ژنتیکی پیش مولدین نسل صفر (F <sub>0</sub> )	.....	۸
۲-۲-۱-نمونه گیری از پیش مولدین نسل صفر (F <sub>0</sub> ) و میگوهای نسل های مختلف	.....	۹
۲-۲-۲-استخراج ماده ژنتیکی DNA	.....	۹
۲-۲-۳-تعیین کیفیت و کمیت ماده ژنتیکی استخراج شده	.....	۱۰
۲-۳-نسل های مختلف میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص	.....	۱۱
۲-۴-تعیین تفاوت های ژنتیکی نسل های مختلف میگوی عاری از بیماری خاص	.....	۱۲
۲-۴-۱-تکثیر ناحیه 16S rRNA، DNA میتو کندریایی	.....	۱۲
۲-۵-بهبود سازی آغازگر واکنش PCR	.....	۱۲
۲-۵-۱-بهبود سازی آغازگر منطقه 16S rRNA میتو کندریال	.....	۱۲
۲-۶-تکثیر منطقه 16S rRNA میتو کندریال	.....	۱۳
۲-۷-ارزیابی کیفیت محصولات PCR حاصل از آغازگر 16S rRNA میتو کندریال	.....	۱۴
۲-۷-۱-توالی یابی محصولات PCR	.....	۱۴
۲-۷-۲-بازسازی توالی های هر نمونه	.....	۱۴
۲-۸-آنالیز فیلوژنتیک توالی ها با استفاده از نرم افزارها	.....	۱۵
۲-۹-تجزیه و تحلیل داده های بدست آمده	.....	۱۷
۳-نتایج	.....	۱۸
۳-۱-نتایج تعیین توالی منطقه 16S rRNA، DNA میتو کندریال	.....	۱۸
۳-۲-مقایسه اولیه توالی های منطقه 16S rRNA، DNA میتو کندریال با سایر توالی های مشابه	.....	۲۰
۳-۳-همردیفی توالی های ناحیه 16S rRNA نسل های مختلف میگو	.....	۲۲
۳-۴-همردیفی اولیه توالی های ناحیه 16S rRNA نسل های مختلف میگو با توالی های موجود	.....	۲۳
در بانک جهانی ژن	.....	۲۳
۳-۵-ترکیب نوکلئوتیدی حاصله از همردیفی توالی های ناحیه 16S rRNA نسل های مختلف	.....	۲۴
میگو	.....	۲۴

۳-۶- تخمین MCL الگوی جانشینی نوکلئوتیدی برای بازها.....	۲۵
۳-۷- شاخص‌های ژنتیکی نسل‌های مختلف میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص.....	۲۵
۳-۸- آنالیز فیلوژنتیک توالی 16S rRNA میتوکندریال نسل‌های مختلف میگو.....	۲۶
۴- بحث.....	۳۱
۵- نتیجه‌گیری.....	۳۵
منابع.....	۳۶
چکیده انگلیسی.....	۳۹

## چکیده

در این مطالعه سعی شد بعد از تعیین تاریخچه و منشاء ورود مولدین میگوی سفید غربی مراکز تکثیر کشور دو جمعیت مولوکائی و های‌هلت به عنوان مولدین نسل صفر میگوی عاری از بیماری خاص در نظر گرفته شدند. از آمیزش درون گروهی و بین گروهی صورت گرفته میان مولدین نر و ماده دو جمعیت فوق در نهایت سه ذخیره مختلف  $\text{♀M} \times \text{♂H}$ ،  $\text{♀H} \times \text{♂M}$  و  $\text{♂H} \times \text{♀H}$  در نسل اول تولید شدند که در ادامه میگوهای ذخیره  $\text{♀M} \times \text{♂H}$  جهت تولید میگوهای نسل دوم بکار برده شدند. لذا هدف از این مطالعه تعیین تفاوت‌های ژنتیکی میان نسل‌های مختلف میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص در بررسی ژنوم منطقه 16S rRNA میتوکندریال بود. نتایج حاکی از آن بود که از ۴۸۶ جایگاه شناسایی شده ۴۸۴ جایگاه بصورت محافظت شده مشاهده شد. جایگاه مونومورف در دامنه ۴۸۶-۴۸۲ قرار داشت و شامل ۲ جایگاه پلی مورف و ۲ جایگاه انتقالی بود. این در حالی بود تنها ۲ هاپلو تیپ شناسایی شد که میزان تنوع هاپلو تیپی و تنوع نوکلئوتیدی محاسبه شده به ترتیب  $0/356 \pm 0/159$  و  $0/0147$  محاسبه شد، که این میزان حاکی از پائین بودن میزان تنوع هاپلو تیپی و نوکلئوتیدی در نسل‌های مختلف میگوی سفید غربی بود. همچنین با توجه به شباهت بالای ژنتیکی نسل‌های مختلف میگو و کاهش فاصله ژنتیکی میان آنها میزان تمایز ژنتیکی و جریان ژنی بین نسل‌های مختلف میگو به ترتیب  $0/142$  و  $2/00$  بود که این حالت ممکن است به دلیل کوچک شدن جمعیت مؤثر و رانش ژنتیکی اتفاق افتاده باشد. لذا با توجه به اینکه ژنوم میتوکندری از مادر به فرزندان به ارث می‌رسد، انتظار می‌رود که میزان تنوع در این ژنوم تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله رانش ژنتیکی به دلیل عدم دسترسی به مولدین جدید قرار گرفته باشد. از این رو مشاهده شد که به دلیل حفاظت بالای ژنوم میتوکندری در منطقه 16S rRNA هیچگونه تمایز ژنتیکی میان نسل‌های مختلف میگوی عاری از بیماری خاص مشاهده نشد.

**کلمات کلیدی:** میگوی سفید غربی، ژنوم میتوکندری، قطعه 16S rRNA، تمایز ژنتیکی

## ۱- مقدمه

از نقطه نظر طبقه بندی میگوها در شاخه بندپایان، رده سخت پوستان، فوق راسته ده پایان، خانواده پنائیده قرار می‌گیرند و از ۱۲ جنس و ۳۰۰ گونه تشکیل شده‌اند. بعضی از گونه‌ها به زیر گونه و نژادها تقسیم می‌شوند. در حال حاضر زیر گونه پائین‌ترین سطح قابل ذکر رده بندی است و به عنوان تجمع مجزای جغرافیایی جمعیت‌های محلی گونه تعریف می‌شوند. به عبارت دیگر زیر گونه‌ها گروه‌هایی از جمعیت‌های آمیزش کننده با تفاوت‌های شدید موفولوژیکی همراه با تمایزهای جغرافیایی، اکولوژیکی، تغذیه‌ای یا فیزیولوژیکی هستند. اگر به زیر گونه‌های مختلف یک گونه فرصت داده شود باید قادر باشند تا با هم آمیزش کنند (رهنا و همکاران، ۱۳۹۰). شایان ذکر است که از مهمترین خصوصیات یک گونه وجود جمعیت مختلف در آن گونه است، در واقع جمعیت‌ها گروهی از افراد یک گونه بوده که در یک محدوده جغرافیایی محدود و مشخص با همدیگر زندگی می‌کنند و قادرند ژن‌های خود را بطور مساوی از نسلی به نسل دیگر منتقل نمایند (فریلند، ۱۳۸۹).

از این میان گونه‌های مختلف میگو، گونه پنئوس سمی سولکاتوس (بری سبز)، پنئوس ایندیکوس (سفید هندی)، لیتوپنئوس وانامی (سفید غربی)، پنئوس مونودون (بری سیاه)، میگوی لیتوپنئوس استیلوروستریس (آبی)، ماکروبراکیوم روزنبرگی (آب شیرین)، پنئوس مرگونیسیس (موزی)، متاپنئوس آفینیس (سفید) و پاراپنئوسپیس استیلیفر (میگوی خنجری) از گونه‌های مورد استفاده در صنعت تکثیر و پرورش میگو محسوب می‌شوند. با توجه به آغاز تکثیر و پرورش از سال ۱۹۳۴ امروزه بالغ بر ۵۰ کشور به این صنعت روی آورده‌اند به گونه‌ای که بر اساس آخرین آمار سازمان خوار و بار جهانی فائو میزان تولید این آبی در سال ۲۰۱۴ میلادی به رقمی بالغ بر ۵۴ میلیون تن رسیده است.

در سال‌های اخیر از میان گونه‌های فوق برخی از گونه‌ها از جمله گونه وانامی به واسطه داشتن برخی از ویژگی‌های منحصر به فردی بطور فزاینده‌ای در سرتاسر جهان گسترانیده شده‌اند بطوریکه امروزه بیش از ۹۰ درصد میزان تولیدات صنعت میگو را به خود اختصاص داده است (FAO, 2014). از آنجا که زیستگاه اصلی این گونه سواحل اقیانوس آرام از جنوب مکزیک تا شمال کلمبیا بوده است (Perez Farfante & Kensley 1997)، واردات این گونه به کشور برای اولین بار در سال ۲۰۰۴ میلادی (۱۳۸۳ هجری شمسی) توسط مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی ایران با هدف ایجاد تنوع گونه‌ای و مقابله با مشکلات ناشی از شیوع بیماری لکه سفید در مزارع پرورشی میگوی کشور صورت پذیرفت. لذا در پی افزایش تمایل پرورش دهندگان میگوی کشور به پرورش این گونه، از سال ۱۳۸۴ بخش خصوصی اقدام به واردات این گونه از مناطق مختلف جهان به کشور نمود بطوریکه پس از گذشت چند سال این گونه بطور کامل جایگزین گونه ایندیکوس که سال‌ها به عنوان مهمترین گونه پرورشی کشور به حساب می‌آمد شد.

با توجه به رشد و توسعه سریع صنعت تکثیر و پرورش میگو در جهان عوامل بیماری‌زای تهدید کننده این صنعت از جمله باکتریایی، ویروسی، قارچی نیز سریعاً توسعه پیدا نمودند (Nunan et al. 1998). از مهمترین راهکارهای

ارائه شده تولید میگوهای عاری از عوامل بیماری‌زا<sup>۱</sup> و میگوهای مقاوم به عوامل بیماری‌زا<sup>۲</sup> جهت مقابله با خسارات ناشی از عوامل بیماری‌زا در میگوهای خانواده پنائیده بوده است (Pruder *et al.*, 1995; Lotz, 1997). که با انجام این راهکارها از یک سو علاوه بر افزایش تولید میگو در واحد سطح شیوع عوامل بیماری‌زا نیز بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کرد (Fegan & Clifford, 2001).

مطالعه بر روی ویژگی‌های ژنتیکی جمعیت‌های مختلف یک گونه از میگو و تجزیه و تحلیل ارتباطات ژنتیکی بین مولدین می‌تواند ابزار مناسبی برای مدیریت شناسایی ژنتیکی و افتراق‌های ژنتیکی در برنامه‌های پرورشی باشد (Allegrucci *et al.*, 1998; Sekino *et al.*, 2002). در این رابطه بطور معمول از نشانگرهای مولکولی استفاده می‌شود. نشانگرها معیارهایی هستند که با استفاده از آن‌ها می‌توان اعضا یا جمعیت‌های یک گونه یا جنس را از هم تفکیک نمود. نشانگرها را می‌توان به سه دسته، نشانگر موفولوژیکی، سیتوژنتیکی و مولکولی تقسیم بندی نمود. پایه و اساس نشانگرهای مورفولوژیک توالی‌های ژنتیکی هستند. در حقیقت نشانگرهای مورفولوژیک بازتاب توالی‌های ژنتیکی هستند و به صورت غیر مستقیم می‌توان این نشانگرها را نیز نشانگرهای ژنتیکی محسوب نمود. نشانگرهای ژنتیکی یک بخش ژن یا بخشی از توالی DNA است که جایگاه شناخته شده‌ای بر روی کروموزوم دارد و می‌توان آن را برای شناسایی افراد یا گونه‌ها به کار برد. بطور کلی هر صفتی که بین افراد متفاوت باشد ناشی از تفاوت‌های موجود بین توالی DNA آنها است و این تفاوت‌ها می‌توانند به عنوان مارکر ژنتیکی (مولکولی) به کار برده شوند (Chawla, 2002).

در دهه‌های گذشته، DNA میتوکندری بصورت گسترده به عنوان شاخص ژنتیکی جهت تعیین ساختار ژنتیکی موجودات، ارتباط فیلوژنتیک و الگوهای جریان ژنی مورد استفاده قرار گرفته است (Shen *et al.*, 2007). ساختار ژنوم میتوکندری در میگوهای جنس پئوس مانند سایر موجودات یک مولکول دو رشته‌ای حلقوی dsDNA است. محتویات آن شامل ۲ ژن RNA ریبوزومی (12S rRNA & 16S rRNA) ۲۲ ژن tRNA و ۱۳ ژن تولید کننده پروتئین است. این ژنوم حاوی یک ناحیه کنترل همانند سازی تحت عنوان d-loop است (Shen *et al.*, 2007). ژنوم میتوکندریایی بر خلاف ژنوم هسته فاقد اینترون بوده بدین معنی که ژن‌ها بصورت متراکم قرار دارند و برخی از ژن‌ها با یکدیگر همپوشانی دارند (رهنما و همکاران، ۱۳۹۰). ژنوم میتوکندری در میگوی وانامی و میگوی چینی به ترتیب دارای ۱۵۹۸۹ جفت باز و ۱۶۰۰۴ جفت باز است (Shen *et al.*, 2007).

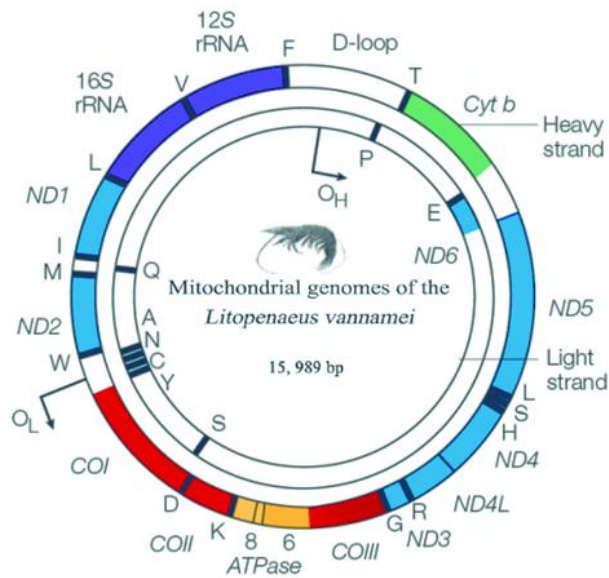
مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها بر اساس نشانگرهای میتوکندریایی جهت بررسی شجره نامه‌ها از طریق ژنوم میتوکندری در عمده کشورهای پیشرفته و توسعه یافته گزارش شده است (Ballinger *et al.*, 1992). نشانگرهای میتوکندریایی در مقایسه یا نشانگرهای دیگر دارای مزیت‌هایی متعددی هستند که مهمترین آنها شامل عدم وقوع

1 - Specific pathogen-free (SPF)

2 - Specific pathogen-resistance (SPR)



نو ترکیبی، وراثت مادری، هاپلوئید بودن آن نرخ بالای جهش می‌باشد (سلحشور و همکاران، ۱۳۸۴؛ Calo-Mata *et al.*, 2009). از دیگر مزایای ژنوم میتوکندری کوچک بودن آن می‌باشد که در نتیجه منجر به این شده که کار کردن با آن راحت‌تر باشد (Hölzle *et al.*, 1991). این ویژگی، میتوکندری را به عنوان یک ابزار مفید جهت تعیین روابط فیلوژنتیک موجودات معرفی نموده است. این نشانگر برای تعیین پیوستگی جمعیت‌ها و تکامل موجودات و آنالیز فیلوژنتیکی یک ابزار مفید و مناسب است (Shih *et al.*, 2011) (شکل ۱).



شکل ۱: ژنوم میتوکندریایی میگوی سفید غربی

رایج ترین نشانگرهای میتوکندریایی شامل ژن‌های 12SrRNA، 16SrRNA، COI، d-loop و ژن سیتوکروم b می‌باشند. اخیراً ناحیه 16SrRNA/tRNA val به عنوان یک نشانگر میتوکندریایی مطرح شده است (Calo-Mata *et al.*, 2009). در گذشته برای تعیین رابطه فیلوژنی میان گونه‌های مختلف از جمله میگوها از نشانگرهای میتوکندریایی COI و 16SrRNA استفاده می‌شد.

ژنوم 16SrRNA در مقایسه با COI دارای سرعت پائین تر تکاملی است. این بیان کننده این است که این نشانگر در مقایسه با COI بیشتر حفاظت شده است (Meyer, 1994). استفاده از ناحیه 16SrRNA/tRNA val برای تعیین رابطه فیلوژنتیک بین گونه‌های میگوهای خانواده پنائیده، سطح تنوع بیشتری را نسبت به 16S rRNA و COI نشان می‌دهند (Calo-mata *et al.*, 2009). این ناحیه در میگوهای خانواده پنائیده حدود 530 bp طول دارد و در مقایسه یا دو نشانگر قبلی سرعت تکاملی بالاتری را نشان می‌دهد و به این مفهوم که کم‌تر حفاظت شده است و چند شکلی بیشتری دارد. به عبارتی این نشانگر جایگاه‌های متغیر بیشتری نسبت به COI و 16S rRNA دارد (حدود ۵۶ درصد برای 16SrRNA/tRNA val و ۴۲/۷ درصد برای COI و ۳۳/۴ درصد برای 16SrRNA). وجود جایگاه‌های

متغیر بیشتر در ناحیه 16SrRNA/tRNA val در مقایسه با COI و 16SrRNA باعث شده است که استفاده از این نشانگر جهت طبقه بندی و دسته بندی کردن گونه‌های نزدیک بهتر عمل کند (Pascoal *et al.*, 2008 a,b). در حقیقت 16SrRNA تناسب بیشتری برای مطالعه روابط فیلوژنتیک بین گونه‌ها دارد ولی می‌توان از COI نیز جهت مطالعه روابط فیلوژنتیک بین گونه‌ای و درون گونه‌ای استفاده نمود (Calo-Mata *et al.*, 2009).

لذا با توجه به مطالب فوق از مهمترین روش‌های بررسی تفاوت‌های ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف بررسی ژنوم مناطق مختلف DNA میتوکندریال می‌باشد. DNA میتوکندریال (mtDNA) دارای سطح بالایی از پلی مورفیسم بوده و ارزبایی آن ۱۰ برابر سریعتر از ژنوم‌های هسته‌ای انجام می‌شود. عنوان شده ژنوم این بخش بصورت مادری و غیرجنسی به ارث می‌رسد (Awadalla *et al.*, 1999). از ویژگی‌های DNA میتوکندریال این است که در مطالعات ژنتیکی و فیلوژنتیک در آبری پروری و جمعیت‌های وحشی میگو مورد استفاده قرار می‌گیرند. (Allegrucci *et al.*, 1998; Baldwin *et al.*, 1998; Klinbunga *et al.*, 1999). ژنوم منطقه 16S rRNA بخشی از ژن محافظت شده DNA میتوکندریال است که بطور وسیعی در مطالعات فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، در حالیکه ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) بنظر می‌رسد که نقاط محافظت شده کمتری نسبت به 16S rRNA دارد و به کرات در مطالعات تکاملی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Beard *et al.*, 1993). از این رو منطقه 16S rRNA میتوکندریال به شدت محافظت شده و به میزان کمی تکامل یافته است (Meyer, 1994). لذا در تبعیض میان گونه‌ها نسبت به درون گونه به میزان دقیق تری عمل می‌کند.

آنالیزهای فیلوژنتیک، تنوع مولکولی و رابطه تکاملی بین توالی‌ها را فراهم می‌کنند. با این آنالیزها، سرعت‌های تکاملی ژن‌ها و سایر اطلاعات تکاملی تخمین زده می‌شود (Tamura *et al.*, 2011). در آنالیزهای فیلوژنتیکی تخمین فاصله ژنتیکی میان توالی‌ها و همچنین ساخت درخت فیلوژنتیک بر مبنای نتایج همریدیفی‌های انجام شده صورت می‌گیرد. ماتریکس فاصله ژنتیکی نسل‌های مختلف میگو بر اساس مترادف نوکلئوتیدی ناحیه 16S rRNA با استفاده از مدل Kimura 2-Parameter با پشتوانه تکرار ۱۰۰۰ (Bootstrap 1000)، همراه با در نظر گرفتن جانیشینی‌های ترانزیشن و ترانسورژن، سرعت یکنواخت و الگوی هموزن بین افراد و حذف کامل Gap‌ها و داده‌های غلط با استفاده از نرم افزار MEGA 7 محاسبه می‌شود (Tamura *et al.*, 2011).

در این رابطه عنوان شده بیشترین جهش‌های نقطه‌ای شامل جهش‌های جانیشینی است که در آن یک نوکلئوتید جایگزین نوکلئوتید دیگر می‌شود. این جهش‌ها به دو دسته ترانسورژن و ترانزیشن تقسیم می‌شوند. ترانسورژن زمانی اتفاق می‌افتد که یک نوکلئوتید پورین به پیریمیدین یا بالعکس تبدیل شود و ترانزیشن زمانی حادث می‌شود که یک نوکلئوتید پورین به نوکلئوتید پورین یا یک نوکلئوتید پیریمیدین به نوکلئوتید پیریمیدین تبدیل شود. شایان ذکر است که نسبت ترانزیشن به ترانسورژن مولکولی بسیار مهم است.

در این مطالعه در ابتدا با نمونه گیری از بافت عضلانی پای شنای نسل‌های مختلف میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص در کشور با استفاده از با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژنوم 16S rRNA، DNA میتوکندریال

علاوه بر تعیین شاخص‌های ژنتیکی شامل میزان فاصله ژنتیکی، میزان تنوع هاپلوتیپی، تنوع نوکلئوتیدی و پلی مورفیسم بودن مقادیر تفاوت‌های ژنتیکی میان میگوهای نسل‌های مختلف میگوی عاری از بیماری خاص بمنظور به‌گزینی میگوهای اصلح تعیین گردید.

## ۲- مواد و روش کار

### ۲-۱- تعیین تاریخچه واردات مولدین میگوی سفید غربی به کشور

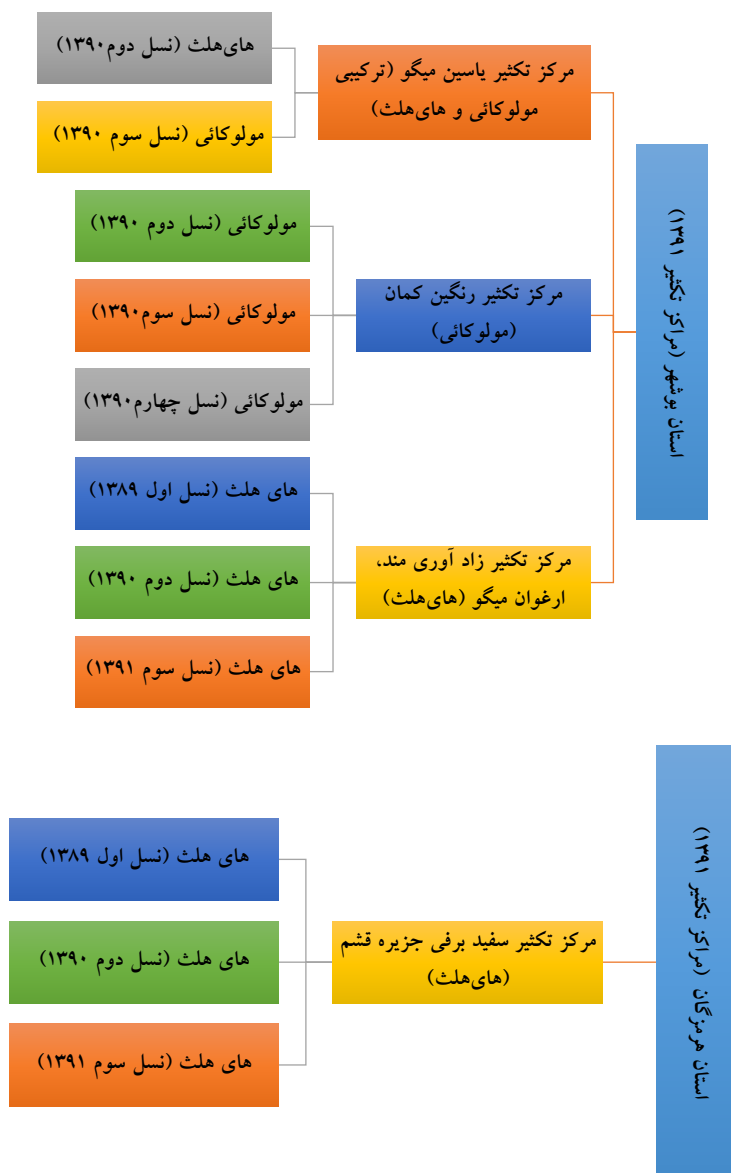
از آنجا که میگوهای سفید غربی به عنوان یک گونه غیربومی در کشور محسوب می‌گردد. لذا منشاء واردات این گونه در جهان از چهار مرکز انستیتو اوشنیک<sup>۱</sup>، مرکز آبی پروری های هلت<sup>۲</sup>، سواحل دریایی کانابای<sup>۳</sup> و مزارع پرورشی مولوکائی<sup>۴</sup> می‌باشد. در این مطالعه تعیین تاریخچه واردات مولدین میگوی سفید غربی به مراکز تکثیر و پرورش میگوی کشور براساس اطلاعات اخذ شده از ادارات کل شیلات استان‌های بوشهر، خوزستان و هرمزگان صورت پذیرفت (شکل ۲).



شکل ۲: استان‌های فعال در زمینه پرورش میگو در سطح کشور

اطلاعات حاکی از آن بود که در طی سال‌های ۸۶ تا ۸۹ بخش خصوصی اقدام به واردات مولد میگوی سفید غربی به کشور از مناطق مختلفی همچون دانشگاه هلونولو واقع در منطقه هاوایی، سواحل کانابای، سواحل مولوکای و میگوهای های هلت مرکز انستیتو Oceanic نموده است و در طول سال‌های ۹۰-۹۱ مراکز تکثیر فعال در سطح کشور با جمع آوری پیش مولد از مراکز پرورش بویژه در استان‌های بوشهر و هرمزگان مولد مورد نیاز خود را تأمین نموده بودند. از این رو با توجه به اطلاعات بدست آمده از مولدین موجود در مراکز تکثیر نمونه‌گیری از بافت مولدین بمنظور تعیین و بررسی شاخص‌های ژنتیکی مولدین نسل صفر میگوی عاری از بیماری خاص صورت پذیرفت (نمودار ۱).

1 -The Oceanic Institute (OI)  
2 -High Health Aquaculture Inc.  
3 -Kona Bay Marine Resources (now IAI Co.)  
4 -Molokai Sea Farms



نمودار ۱: نمودار تاریخچه و منشاء ورود مولدین میگوی سفید غربی به کشور

## ۲-۲- تعیین شاخص های ژنتیکی پیش مولدین نسل صفر (F<sub>0</sub>)

بمنظور تعیین شاخص های ژنتیکی، به گزینی و دستیابی به جمعیت های مختلف نسل صفر میگوی عاری از بیماری خاص، براساس اطلاعات حاصل از منشاء مولدین هر یک از مراکز تکثیر و همچنین اطلاعات بدست آمده از مطالعات مولکولی ریزماهواره ای صورت گرفته در این طرح، علاوه بر ردیابی پست لاروهای تولید شده از مراکز تکثیر در مراکز پرورش میگوی استان های مختلف انتخاب مزارع پرورشی بمنظور انجام مطالعات مولکولی و به گزینی پیش مولدین نسل صفر بر اساس نوع مدیریت و همچنین میزان رشد و بازماندگی میگوهای پرورش داده شده صورت پذیرفت (جدول ۱).

**جدول ۱: انتخاب مراکز پرورش میگوی سفید غربی با توجه به منشاء مولدین**

ردیف	سایت پرورشی	مزرعه	منشاء مولدین
۱	حله	تعاونی ۲۷۲	High Health
۲	بندر ریگ	تعاونی ۶۷۸	Molokai
۳	دلوار ۱۴	یاسین میگو	Mix

**۱-۲-۲- نمونه گیری از پیش مولدین نسل صفر (F<sub>0</sub>) و میگوهای نسل‌های مختلف**

در این مطالعه از اواخر خرداد تا اوایل شهریور ماه ۱۳۹۱ با انتخاب ۸ مرکز پرورش واقع در استان بوشهر نمونه گیری از بافت عضلانی ۲۴۰ قطعه پیش مولد میگوی سفید غربی انجام شد. بمنظور حفظ نمونه‌های بافتی، نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در الکل ۹۶ درجه در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Tamayo, 2006) (شکل ۳).



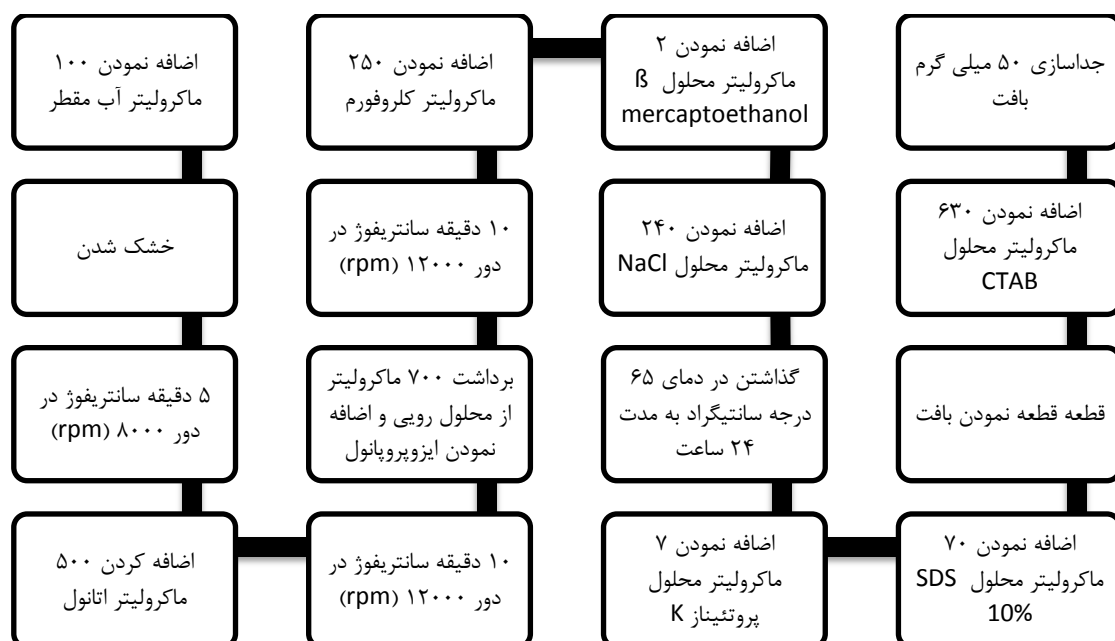
شکل ۳: نمونه گیری از بافت عضله میگوهای پرورشی مراکز پرورش و نگهداری در الکل ۹۶ درجه

**۲-۲-۲- استخراج ماده ژنتیکی DNA**

در این مطالعه بمنظور استخراج ماده ژنتیکی DNA از روش CTAB استفاده شد. روش کار بدین صورت بود که بعد از جدا سازی ۵۰ میلی گرم از بافت عضله میگو و قرار دادن آن در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتر بمنظور هضم بافت از ۶۳۰ میکرولیتر محلول CTAB، ۷۰ میکرولیتر محلول SDS 10% و ۷ میکرولیتر آنزیم پروتیناز K استفاده شد. در ادامه پس از گذشت یک شبانه روز به هر کدام از نمونه‌ها ۲۴۰ میکرولیتر محلول NaCl همراه با ۲ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول و ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده شد که بعد از ته نشین نمودن DNA نمونه‌ها و شستشوی آن‌ها توسط اتانول به هر کدام از نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی دوبار تقطیر اضافه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد (Valles-Jimenez et al., 2004) (شکل ۴ و نمودار ۲).



شکل ۴: خرد کردن و هموژنیزه نمودن بافت عضلانی میگوها

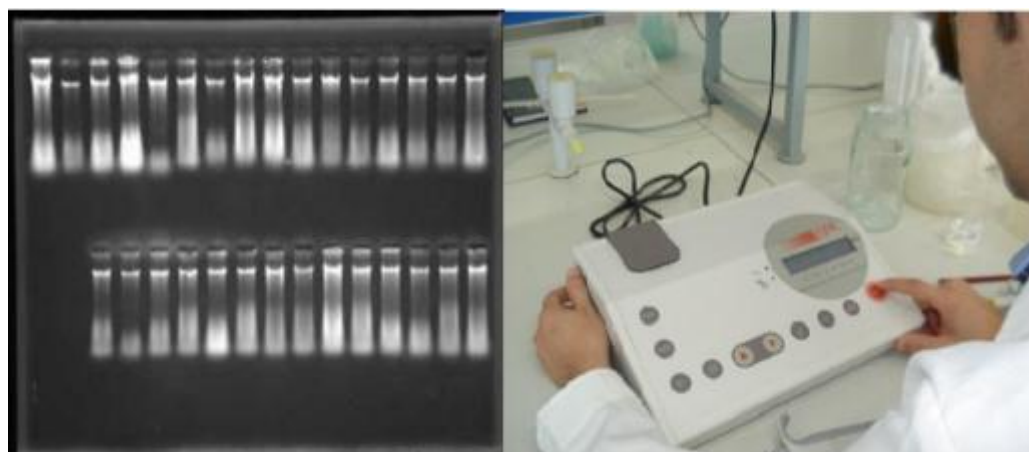


#### نمودار ۲: مراحل استخراج ماده ژنتیکی DNA از طریق روش CTAB

#### ۳-۲-۲- تعیین کیفیت و کمیت ماده ژنتیکی استخراج شده

بمنظور تعیین کیفیت DNA های استخراج شده بعد از انتقال ماده ژنتیکی DNA به ژل آگاروز ۱ درصد با استفاده از دستگاه الکتروفورز افقی کلور براساس وجود یا عدم وجود باندها و شارپ بودن آن کیفیت DNA ها تعیین گردید. همچنین بمنظور تعیین کمیت DNA از دستگاه اسپکتوفتومتر مدل WFA 1101 در طول موج‌های ۲۶۰ و

۲۸۰ نانومتر و معادله  $\frac{260}{280}$  میزان کمیت ماده ژنتیکی تعیین شد (Soto-Hernandez & Grijalva-Chon, 2005) (شکل



شکل ۵: تعیین کمیت و کیفیت DNA نمونه‌های استخراج شده

### ۳-۲- نسل‌های مختلف میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص

در این مطالعه با توجه به اطلاعات حاصل مطالعات مولکولی ریزماهوره‌ای به‌گزینه مولدین نسل صفر میگوی سفید غربی در نسل‌های مختلف براساس منشاء ورود و داده‌های حاصل از شاخص‌های ژنتیکی از قبیل فراوانی آلل، هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی قابل انتظار، میزان ضریب هم‌خونی، جریان ژنی، فاصله ژنتیکی، شباهت ژنتیکی و تعادل هاردی-واینبرگ صورت گرفت. لذا با توجه به‌گزینه صورت گرفته و نتایج حاصل از آزمایشات بیماری‌شناسی در نسل صفر دو جمعیت مولوکائی و های‌هلت از سه جمعیت مولوکائی، های‌هلت و ترکیبی (مخلوط مولوکائی و های‌هلت) میگوی سفید غربی جمع‌آوری شده از مراکز پرورش میگوی کشور به‌عنوان مولدین نسل صفر میگوهای عاری از بیماری خاص در نظر گرفته شدند. این در حالی بود که در نسل اول از تلاقی درون‌گروهی و بین‌گروهی صورت گرفته میان مولدین نر و ماده دو جمعیت نسل صفر در نهایت سه ذخیره  $\text{M} \times \text{H}$ ،  $\text{H} \times \text{M}$  و  $\text{H} \times \text{H}$  تولید شد. در ادامه با توجه به شاخص‌های ژنتیکی بدست آمده از پروژه ارزیابی و تعیین شاخص‌های مؤثر در انتخاب مولدهای اصلح میگوهای ذخیره  $\text{M} \times \text{H}$  به منظور تولید میگوهای نسل دوم انتخاب شدند (شکل ۶).





شکل ۶: به‌گزینی پیش مولدین میگوی نسل صفر

#### ۲-۴- تعیین تفاوت‌های ژنتیکی نسل‌های مختلف میگوی عاری از بیماری خاص

##### ۲-۴-۱- تکثیر ناحیه 16S rRNA DNA میتوکندریایی

در این مطالعه واکنش PCR استاندارد جهت تکثیر قطعات هدف با وزن ۵۲۹ مورد استفاده قرار گرفت. بمنظور تکثیر منطقه 16S rRNA میتوکندریال از یک پرایمر اختصاصی استفاده شد (Simon *et al.*, 1991) (جدول ۲). لذا در ابتدا محصول PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر بافر Mster Mixes (شرکت سیناکلون) همراه با ۱ میکرولیتر (پرایمر پیشرو)، ۱ میکرولیتر (پرایمر معکوس)، ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر و ۲ میکرولیتر DNA نمونه تهیه شد که پس از مشاهده باندها در محدوده وزن ۵۲۹ bp حجم نهایی به ۵۰ میکرولیتر افزایش پیدا کرد.

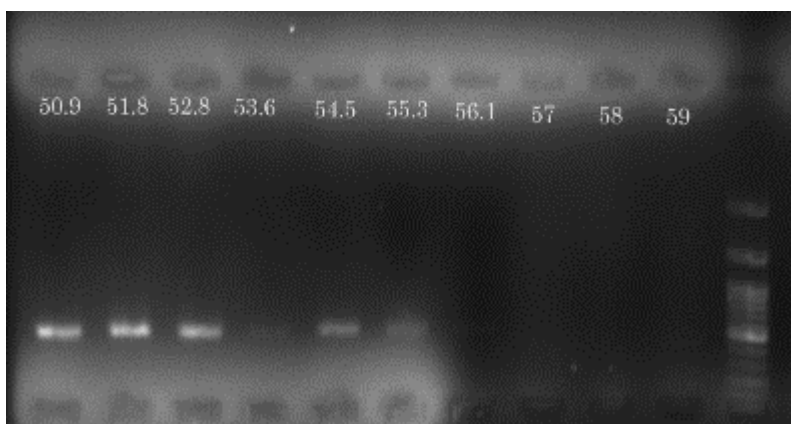
جدول ۲: توالی پیشرو و معکوس ژنوم 16S rRNA میتوکندریال میگوی سفید غربی

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر
16S-Forward	5'-GCCTGTTTAACAAAAACAT-3'
16S-Reverse	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCATGT-3'

##### ۲-۵- بهینه‌سازی آغازگر واکنش PCR

##### ۲-۵-۱- بهینه‌سازی آغازگر منطقه 16S rRNA میتوکندریال

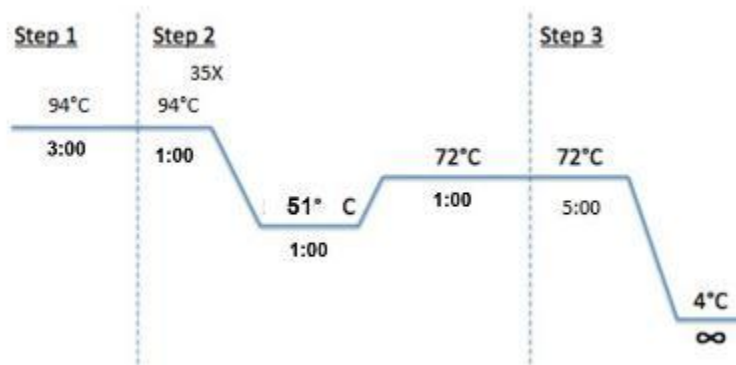
بنمظور تکثیر قطعه 16S rRNA در ابتدا واکنش‌های PCR بهینه‌سازی شدند. بدین صورت که با تغییر غلظت DNA الگو و گرادیانت دمایی (۶۰-۵۸ درجه سانتی‌گراد) بهینه‌سازی واکنش PCR انجام شد. از این رو با توجه شارپ بودن جفت بازهای تشکیل شده در طول ۵۲۹ bp درجه حرارت دمایی ۵۱ درجه سانتی‌گراد مناسب‌ترین درجه حرارت برای اتصال پرایمر به قطعه هدف در نظر گرفته شد (شکل ۷).



شکل ۷: گرادینت دمایی آغازگر منطقه 16S rRNA میتوکندریال

### ۶-۲- تکثیر منطقه 16S rRNA میتوکندریال

تکثیر مناطق فوق با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Corbet صورت گرفت. شایان ذکر است که تکثیر منطقه 16S rRNA میتوکندریال DNA توسط دستگاه ترموسایکلر از سه مرحله تشکیل شده بود، مرحله اول شامل واسرشت شدن اولیه<sup>۱</sup> در درجه حرارت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه برای یک چرخه، مرحله دوم شامل واسرشت شدن<sup>۲</sup> در ۹۴ درجه سانتیگراد، اتصال به قطعه هدف<sup>۳</sup> در درجه حرارت ۵۱ درجه سانتیگراد و بسط شدن<sup>۴</sup> در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد هر کدام به مدت ۶۰ ثانیه برای ۳۵ چرخه تنظیم گردید. در انتها بسط نهایی<sup>۵</sup> در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه در یک چرخه صورت پذیرفت (Francisco *et al.*, 2005) (شکل ۸).



شکل ۸: الگوی دمایی تکثیر ژنوم منطقه 16S rRNA میتوکندریال

- 1-Pre denature
- 2-Denature
- 3-Annealing
- 4-Extraction
- 5-Final Extraction

## ۲-۷-۲- ارزیابی کیفیت محصولات PCR حاصل از آغازگر 16S rRNA میتوکندریال

پس از دستیابی به محصول PCR حاصل از تکثیر DNA میتوکندریال میگوهای نسل‌های مختلف، ۵ میکرولیتر محصول PCR به درون چاهک‌های ایجاد شده بر روی ژل آگاروز ۱ درصد مخلوط شده با ۲-۱/۵ میکرولیتر رنگ Safe stain همراه با نشانگر استاندارد<sup>۱</sup> ۱۰۰-۳۰۰۰ bp تزریق شد، که بعد از ران نمودن دستگاه الکتروفورز افقی مدل کلور به مدت ۴۰-۳۵ دقیقه، با توجه به طول نشانگر استاندارد بر اساس وجود یا عدم وجود باندهای شارپ تشکیل شده در طول ۵۲۹ bp انتخاب نمونه‌ها صورت گرفت و تصویر ژل آگاروز توسط دستگاه مستند سازی ژل با کمک برنامه پرتابل دستگاه ثبت و ذخیره سازی گردید (Simon *et al.*, 1991; Francisco *et al.*, 2005) (شکل ۹).



شکل ۹: ارزیابی کیفیت محصولات PCR حاصل از آغازگر 16S rRNA میتوکندریال

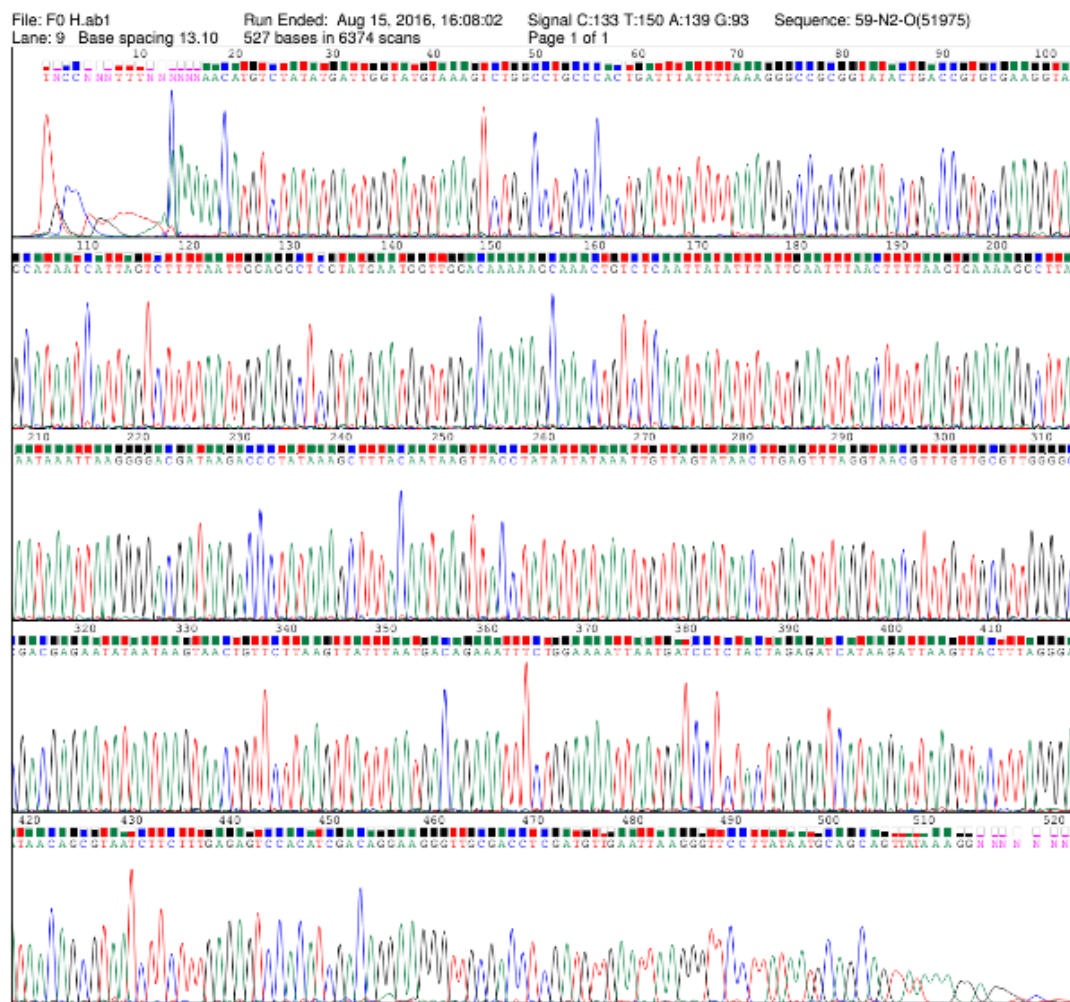
### ۲-۷-۱- توالی‌یابی محصولات PCR

در این مطالعه توالی‌یابی قطعه 16S rRNA، DNA میتوکندریال بر اساس روش Sanger و همکاران (۱۹۷۷) توسط توالی‌یاب اتوماتیک ABI 377 (Applied Biosystems Inc.) توسط شرکت Seq/Teq/California/USA انجام شد. شایان ذکر است که تعیین توالی نمونه‌های مربوط به قطعه 16SrRNA، DNA میتوکندریال بصورت اختصاصی از یک طرف بر اساس استفاده از آغازگر 16S-Reverse انجام شد.

### ۲-۷-۲- بازسازی توالی‌های هر نمونه

تمام نمونه‌ها با استفاده از آغازگر اختصاصی از یک طرف تعیین توالی شدند. بنابراین از هر نمونه، یک توالی موجود بود که از سمت 3' ژن (توالی بدست آمده با استفاده از آغازگر معکوس) انجام شد. لذا می‌بایست طول کامل محصول PCR توسط تطبیق این دو توالی تعیین شود. از این رو در ابتدا صحت توالی‌های بدست آمده با

استفاده از نرم افزار Chromas Pro بر اساس کروماتوگرام هر توالی مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه با استفاده از نرم افزارهای BioEdit طول کامل هر نمونه بازسازی و ذخیره گردید (شکل ۱۰).



شکل ۱۰: توالی نمونه‌های نسل‌های مختلف میگو

### ۸-۲- آنالیز فیلوژنتیک توالی‌ها با استفاده از نرم افزارها

مقایسه اولیه توالی‌های حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم افزار آنالاین ClustalW2 انجام شد (Larkin *et al.*, 2007). در ادامه با استفاده از نرم افزار Nuoclotid Blast مقایسه توالی‌های بدست آمده با توالی‌های مشابه در سایت NCBI صورت پذیرفت (Altschul *et al.*, 1990) (شکل ۱۱).

Litopenaeus vannamei clone 100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence;  
mitochondrial gene for mitochondrial product

Sequence ID: [AY344191.1](#) Length: 529 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 481		<a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>		Next Match	Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
889 bits(481)	0.0	481/481(100%)	0/481(0%)	Plus/Plus	
Query	34	GGTATGTAAGTCTGGCCTGCCCACTGATTTATTTAAAGGGCCGCGGTATACTGACCGT		93	
Sbjct	1	GGTATGTAAGTCTGGCCTGCCCACTGATTTATTTAAAGGGCCGCGGTATACTGACCGT		60	
Query	94	GCGAAGGTAGCATAATCATTAGTCTTTTAATTGGAGGCTCGTATGAATGGTTGGACAAAA		153	
Sbjct	61	GCGAAGGTAGCATAATCATTAGTCTTTTAATTGGAGGCTCGTATGAATGGTTGGACAAAA		120	
Query	154	AGCAAACGTCTCAATTATATTTATTGAATTTAACTTTTAAGTGAAAAGGCTTAAATAAA		213	
Sbjct	121	AGCAAACGTCTCAATTATATTTATTGAATTTAACTTTTAAGTGAAAAGGCTTAAATAAA		180	
Query	214	TTAAGGGGACGATAAGACCCTATAAAGCTTTACAATAAGTTACCTATATTATAAATTGTT		273	
Sbjct	181	TTAAGGGGACGATAAGACCCTATAAAGCTTTACAATAAGTTACCTATATTATAAATTGTT		240	
Query	274	AGTATAACTTGAGTTTAGGTAACGTTTGTTCGTTGGGGCAGCAGAAATATAATAAGTAA		333	
Sbjct	241	AGTATAACTTGAGTTTAGGTAACGTTTGTTCGTTGGGGCAGCAGAAATATAATAAGTAA		300	
Query	334	CTGTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAAATTTCTGGAAAATTAATGATCCTCTACTAGAGA		393	
Sbjct	301	CTGTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAAATTTCTGGAAAATTAATGATCCTCTACTAGAGA		360	
Query	394	TCATAAGATTAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATCTTCTTTGAGAGTCCACATCGAC		453	
Sbjct	361	TCATAAGATTAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATCTTCTTTGAGAGTCCACATCGAC		420	
Query	454	AGGAAGGGTTGCGACCTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTTATAATGCAGCAGTTATAAAG		513	
Sbjct	421	AGGAAGGGTTGCGACCTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTTATAATGCAGCAGTTATAAAG		480	
Query	514	G	514		
Sbjct	481	G	481		

### شکل ۱۱: مقایسه توالی‌های بدست آمده با توالی‌های منطقه 16S rRNA در سایت جهانی ژن

همردیفی چندگانه کلاستال (ClustalW Multiple Alignment) با استفاده از نرم افزار BioEdit با هدف محاسبه ترکیب بازی توالی‌ها و نسبت جانیشینی ترانزیشن به ترانسورژن انجام شد (Thompson *et al.*, 1994). در ادامه بمنظور دستیابی به ماتریکس فاصله ژنتیکی براساس روش Kimura-2-parameter (Kimura, 1980) و شرایطی از قبیل حذف کامل Gap یا حذف بازهای جفت جفت (Pairwise) با در نظر گرفتن جهش‌های ترانزیشن و ترانسورژن، سرعت یکنواخت و الگوی همورژن بین افراد با استفاده از نرم افزار MEGA 7.0 محاسبه شد (Tamura *et al.*, 2011).

روش کار بدین صورت بود که بعد از انجام Blast، توالی‌های ناحیه 16SrRNA، DNA میتوکندریال میگوهای نسل‌های مختلف عاری از بیماری خاص با توالی‌های مشابه استخراج شده از بانک جهانی ژن (NCBI) و همردیفی آنها با توالی‌های حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم افزار MEGA 7.0 فاصله ژنتیکی براساس روش Kimura-2-parameter محاسبه شد.

همچنین ترسیم درخت فیلوژنتیک بر اساس آنالیزهای Neighbor-Joining و Maximum Likelihood ترسیم شد.

ساخت درخت فیلوژنتیک و تاریخچه تکاملی بر اساس روش Maximum Likelihood مدل Kimura 2-Parameter (Tamura *et al.*, 2011) صورت گرفت. در ساخت این درخت از پشته‌بندی تکرار ۱۰۰۰ (Bootstrap) استفاده شد (Felsenstein, 1985). درخت اولیه برای جستجوی هیروستیک (Heuristic) به وسیله به کارگیری الگوریتم‌های Neighbor-Joining و BioNJ بصورت اتوماتیک بدست آمد. همچنین پارامتر Nearest-Neighbor-Interchange (NNI) برای روش هیروستیک Maximum Likelihood انتخاب شد. سایر پارامترها برای رسم درخت مذکور شامل سرعت یکنواختی بین نمونه‌ها و حذف کامل Gaps بود (Tamura *et al.*, 2011). تاریخچه تکاملی و ساخت درخت فیلوژنتیک با روش فیلوژنتیک بر اساس مدل Neighbor-Joining استنتاج شد (Saitou & Nei, 1987).

## ۹-۲- تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده

در پایان مطالعه با استفاده از آزمون کلموگراف-اسمیرنوف نرمال نمودن پراکنش داده‌های حاصل از تعداد مناطق محافظت شده، شاخص‌های تنوع مولکولی از قبیل تعداد هاپلوتیپ‌ها، مکان‌های پلی مورف، تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیپی به همراه واریانس بر اساس مدل Nei (1978) با استفاده از نرم افزارهای BioEdit، MEGA 7.0 و DnaSP (Rozas *et al.*, 2003) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

## ۳- نتایج

## ۳-۱- نتایج تعیین توالی منطقه 16S rRNA، DNA میتوکندریال

نتایج حاصل از تعیین توالی منطقه 16S rRNA میتوکندریال توسط نرم افزار ChromasPro و BioEdit حاکی از آن بود که ژن تکثیر شده در نمونه‌ها ۴۸۸-۴۹۸ جفت باز طول داشت. همچنین در شکل ۱۲ توالی منطقه 16S rRNA میتوکندریال میگوی سفید غربی استخراج شده از بانک جهانی ژن (NCBI) می‌باشد که با شماره‌های ژنی نمایش داده شده است.

AY264914.1| *Litopenaeus vannamei*

GATTGGTATGTAAAGTCTGGCCTGCCACTGATTTATTTTAAAGGGCCGCGGTATACTGACCGTGC  
GAAGGTAGCATAATCATTAGTCTTTTAATTGGAGGCTCGTATGAATGGTTGGACAAAAAGCAA  
GTCTCAATTATATTTATTGAATTTAACTTTTAAAGTGAAGGCTTAAATAAATTAAGGGGACGATA  
AGACCCTATAAAGCTTTACAATAAGTTACCTATATTATAAATTGTTAGTATAAAGTTGAGTTT  
ACGTTTGTTCGTTGGGGCGACGAGAATATAAAGTAAGTACTGTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAA  
ATTTCTGGAAAATTAATGATCCTCTACTAGAGATCATAAGATTAAGTTACTTTAGGGATAACAGCG  
TAATCTTCTTTGAGAGTCCACATCGACAGGAAGGGTTGCGACCTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTT  
ATAATGCAGCAGTTATAAAGGAGGGTCTGTTTCGACCTTTA

AF279818.1| *Litopenaeus vannamei*

GGCCTGCCACTGATTTATTTTAAAGGGCCGCGGTATACTGACCGTGCGAAGGTAGCATAATCATT  
AGTCTTTTAATTGGAGGCTCGTATGAATGGTTGGACAAAAAGCAAAGTCTCAATTATATTTATTG  
AATTTAACTTTTAAAGTGAAGGCTTAAATAAATTAAGGGGACGATAAGACCCTATAAAGCTTTAC  
AATAAGTTACCTATATTATAAATTGTTAGTATAAAGTTGAGTTTGGTAACGTTTGTTCGTTGGGGC  
GACGAGAATATAAAGTAAGTACTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAAATTTCTGGAAAATTAATGA  
TCCTCTACTAGAGATCATAAGATTAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATCTTCTTTGAGAGTCCA  
CATCGACAGGAAGGGTTGCGACCTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTTATAATGCAGCAGTTATAAA  
GG

AY344192.1| *Litopenaeus vannamei*

GGTATGTAAAGTCTGGCCTGCCACTGATTTATTTTAAAGGGCCGCGGTATACTGACCGTGCGAAG  
GTAGCATAATCATTAGTCTTTTAATTGGAGGCTCGTATGAATGGTTGGACAAAAAGCAAAGTCTC  
TCAATTATATTTATTGAATTTAACTTTTAAAGTGAAGGCTTAAATAAATTAAGGGGACGATAAGA  
CCCTATAAAGCTTTACAATAAGTTACCTATATTATAAATTGTTAGTATAAAGTTGAGTTTGGTAACG  
TTTGTTCGTTGGGGCGACGAGAATATAAAGTAAGTACTGTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAAATTT  
CTGGAAAATTAATGATCCTCTACTAGAGATCATAAGATTAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAAT  
CTTCTTTGAGAGTCCACATCGACAGGAAGGGTTGCGACCTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTTATA  
ATGCAGCAGTTATAAAGGAGGGTCTGTTTCGACCTTTAAATCCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGG

AY344191.1| *Litopenaeus vannamei*

GGTATGTAAAGTCTGGCCTGCCACTGATTTATTTTAAAGGGCCGCGGTATACTGACCGTGCGAAG  
GTAGCATAATCATTAGTCTTTTAATTGGAGGCTCGTATGAATGGTTGGACAAAAAGCAAAGTCTC  
CAATTATATTTATTGAATTTAACTTTTAAAGTGAAGGCTTAAATAAATTAAGGGGACGATAAGAC  
CCTATAAAGCTTTACAATAAGTTACCTATATTATAAATTGTTAGTATAAAGTTGAGTTTGGTAACG  
TTGTTGCGTTGGGGCGACGAGAATATAAAGTAAGTACTGTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAAATTT  
TGGAAAATTAATGATCCTCTACTAGAGATCATAAGATTAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATC  
TTCTTTGAGAGTCCACATCGACAGGAAGGGTTGCGACCTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTTATA  
TGCAGCAGTTATAAAGGAGGGTCTGTTTCGACCTTTAAATCCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGG

AY344190.1| *Litopenaeus vannamei*

GGTATGTAAAGTCTGGCCTGCCACTGATTTATTTTAAAGGGCCGCGGTATACTGACCGTGCGAAGG  
TAGCATAATCATTAGTCTTTTAATTGGAGGCTCGTATGAATGGTTGGACAAAAAGCAAAGTCTC  
AATTATATTTATTGAATTTAACTTTTAAAGTGAAGGCTTAAATAAATTAAGGGGACGATAAGACC  
CCTATAAAGCTTTACAATAAGTTACCTATATTATAAATTGTTAGTATAAAGTTGAGTTTGGTAACG  
TTGTTGCGTTGGGGCGACGAGAATATAAAGTAAGTACTGTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAAATTTCT  
GGAAAATTAATGATCCTCTACTAGAGATCATAAGATTAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATTT

CTTTGAGAGTCCACATCGACAGGAAGGGTTGCGACCTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTTATAATG  
CAGCAGTTATAAAGGAGGGTCTGTTTCGACCTTTAAATCCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGG

AY344188.1| *Litopenaeus vannamei*

GGTATGTAAAGTCTGGCCTGCCACTGATTTATTTTAAAGGGCCGCGGTATACTGACCGTGCGAA  
GGTAGCATAATCATTAGTCTTTTAATTGGAGGCTCGTATGAATGGTTGGACAAAAAGCAAACCTGTC  
TCAATTATATTTATTGAATTTAACTTTTAAAGTGAAAAGGCTTAAATAAATTAAGGGGACGATAAGA  
CCCTATAAAGCTTTACAATAAGTTACCTATATTATAAATTGTTAGTATAAAGTTAGTTAGGTAACG  
TTTGTTCGTTGGGGCGACGAGAATATAATAAGTAACTGTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAAATTT  
CTGGAAAATTAATGATCCTCTACTAGAGATCATAAGATTAAGTTACTTTAGGATAACAGCGTAATC  
TTCTTTGAGAGTCCACATCGACAGGAAGGGTTGCGACTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTTATAAT  
GCAGCAGTTATAAAGGAGGGTCTGTTTCGACCTTTAAATCCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGGA

AY344187.1| *Litopenaeus vannamei*

GGTATGTAAAGTCTGGCCTGCCACTGATTTATTTTAAAGGGCCGCGGTATACTGACCGTGCGAAG  
GTAGCATAATCATTAGTCTTTTAATTGGAGGCTCGTATGAATGGTTGGACAAAAAGCAAACCTGTC  
CAATTATATTTATTGAATTTAACTTTAAGTGAAAAGGCTTAAATAAATTAAGGGGACGATAAGACC  
CTATAAAGCTTTACAATAAGTTACCTATATTATAAATTGTTAGTATAAAGTTAGTTAGGTAACGTT  
TGTTGCGTTGGGGCGACGAGAATATAATAAGTAACTGTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAAATTTCT  
GGAAAATTAATGATCCTCTACTAGAGATCATAAGATTAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATCT  
TCTTTGAGAGTCCACATCGACAGGAAGGGTTGCGACTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTTATAAT  
GCAGCAGTTATAAAGGAGGGTCTGTTTCGAACTTTAAATCCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGG

AY344186.1| *Litopenaeus vannamei*

GGTATGTAAAGTCTGGCCTGCCACTGATTTATTTTAAAGGGCCGCGGTATACTGACCGTGCGAAG  
GTAGCATAATCATTAGTCTTTTAATTGGAGGCTCGTATGAATGGTTGGACAAAAAGCAAACCTGTC  
CAATTATATTTATTGAATTTAACTTTAAGTGAAAAGGCTTAAATAAATTAAGGGGACGATAAGAC  
CCTATAAAGCTTTACAATAAGTTACCTATATTATAAATTGTTAGTATAAAGTTAGTTAGGTAACGTT  
TTGTTGCGTTGGGGCGACGAGAATATAATAAGTAACTGTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAAATTTCT  
TGGAAAATTAATGATCCTCTACTAGAGATCATAAGATTAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATC  
TTCTTTGAGAGTCCACATCGACAGGAAGGGTTGCGACTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTTATAAT  
GCAGCAGTTATAAAGGAGGGTCTGTTTCGAACTTTAAATCCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGG

AY344185.1| *Litopenaeus vannamei*

GGTATGTAAAGTCTGGCCTGCCACTGAATTTATTTTAAAGGGCCGCGGTATACTGACCGTGCGAA  
GGTAGCATAATCATTAGTCTTTTAATTGGAGGCTCGTATGAATGGTTGGACAAAAAGCAAACCTGTC  
TCAATTATATTTATTGAATTTAACTTTTAAAGTGAAAAGGCTTAAATAAATTAAGGGGACGATAAGA  
CCCTATAAAGCTTTACAATAAGTTACCTATATTATAAATTGTTAGTATAAAGTTAGTTAGGTAACG  
TTTGTTCGTTGGGGCGACGAGAATATAATAAGTAACTGTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAAATTT  
CTGGAAAATTAATGATCCTCTACTAGAGATCATAAGATTAAGTTACTTTAGGATAACAGCGTAATC  
TTCTTTGAGAGTCCACATCGACAGGAAGGGTTGCGACTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTTATAA  
TGCAGCAGTTATAAAGGAGGGTCTGTTTCGACCTTTAAATCCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGGA

AY344184.1| *Litopenaeus vannamei*

GGTATGTAAAGTCTGGCCTGCCACTGATTTATTTTAAAGGGCCGCGGTATACTGACCGTGCGAAG  
GTAGCATAATCATTAGTCTTTTAATTGGAGGCTCGTATGAATGGTTGGACAAAAAGCAAACCTGTC  
CAATTATATTTATTGAATTTAACTTTTAAAGTGAAAAGGCTTAAATAAATTAAGGGGACGATAAGAC  
CCTATAAAGCTTTACAATAAGTTACCTATATTATAAATTGTTAGTATAAAGTTAGTTAGGTAACGTT  
TTGTTGCGTTGGGGCGACGAGAATATAATAAGTAACTGTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAAATTTCT  
TGGAAAATTAATGATCCTCTACTAGAGATCATAAGATTAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATC  
TTCTTTGAGAGTCCACATCGACAGGAAGGGTTGCGACTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTTATAA  
TGCAGCAGTTATAAAGGAGGGTCTGTTTCGACCTTTAAATCCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGG

AF192089.1| *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*

TAAAGTCTGGCCTGCCACTGATTTATTTTAAAGGGCCGCGGTATACTGACCGTGCGAAGGTAGCA  
TAATCATTAGTCTTTTAATTGGAGGCTCGTATGAATGGTTGGACAAAAAGCAAACCTGTCCTCAATTAT  
ATTTATTGAATTTAACTTTTAAAGTGAAAAGGCTTAAATAAATTAAGGGGACGATAAGACCCTATAA  
AGCTTTACAATAAGTTACCTATATTATAAATTGTTAGTATAAAGTTAGTTAGGTAACGTTTGTTCG  
GTTGGGGCGACGAGAATATAATAAGTAACTGTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAAATTTCTGGAAA



ATTAATGATCCTCTACTAGAGATCATAAGATTAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATCTTCTTTG  
AGAGTCCACATCGACAGGAAGGGTTGCGACCTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTTATAATGCAGCA  
GTTATAAAGGAGGGTCTGTT

AF192088.1| *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*

TAAAGTCTGGCCTGCCACTGATTTATTTTAAAGGGCCGCGGTATACTGACCGTGCGAAGGTAGCA  
TAATCATTAGTCTTTTAATTGGAGGCTCGTATGAATGGTTGGACAAAAAGCAAACGTCTCAATTAT  
ATTTATTGAATTTAACTTTTAAAGTGAAGGCTTAAATAAATTAAGGGGACGATAAGACCCTATAA  
AGCTTTACAATAAGTTACCTATATTATAAATTGTTAGTATAACTTGAGTTTAGGTAACGTTTGTTC  
GTTGGGGCGACGAGAATATAATAAGTAACTGTTCTTAAAGTTATTTAATGACAGAAATTTCTGGAAA  
ATTAATGATCCTCTACTAGAGATCATAAGATTAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATCTTCTTTG  
AGAGTCCACATCGACAGGAAGGGTTGCGACCTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTTATAATGCAGCA  
GTTATAAAGGAGGGTCTGTT

شکل ۱۲: توالی نوکلئوتیدهای ژنوم منطقه 16S rRNA میگوهای سفید غربی استخراج شده از بانک جهانی ژن

### ۲-۳- مقایسه اولیه توالی‌های منطقه 16S rRNA، DNA میتوکندریال با سایر توالی‌های مشابه

نتایج حاصل از مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه 16S rRNA میتوکندریال این مطالعه با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار Nucleotide BLAST حاکی از آن بود که ۹۷-۱۰۰ درصد شباهت با نمونه‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن وجود دارد. همچنین مشاهده شد که ۱۰۰ درصد یکسانی میان توالی‌های مربوط به میگوهای های‌هلت (نسل صفر) و مولوکائی‌های‌هلت (نسل دوم) با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن با شماره‌های ژنی KT596762.1، DQ534543.1، EF584003.1، AY046914.1، AJ132780.1 و GU3241 46.1 وجود دارد. این در حالی بود که یکسانی در توالی‌های مربوط میگوهای مولوکائی (نسل صفر)، های‌هلت‌های‌هلت (نسل اول)، های‌هلت‌های‌هلت (نسل اول) با شماره‌های ژنی فوق ثبت شده در بانک جهانی ژن ۹۹ درصد بود (شکل‌های ۱۳ و ۱۴).

۳/28/2016 NCBI Blast-High Health (F0)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Litopenaeus vannamei mitochondrion, complete genome</a>	920	920	100%	0.0	100%	<a href="#">KT596762.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Litopenaeus vannamei mitochondrion, complete genome</a>	920	920	100%	0.0	100%	<a href="#">DQ534543.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Litopenaeus vannamei mitochondrion, complete genome</a>	920	920	100%	0.0	100%	<a href="#">EF584003.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Litopenaeus vannamei 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Val gene, co</a>	920	920	100%	0.0	100%	<a href="#">AY046914.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Penaeus vannamei 16S rRNA gene</a>	920	920	100%	0.0	100%	<a href="#">AJ132780.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Litopenaeus vannamei voucher DAAPV F14 16S ribosomal RNA gene, partial sequanc</a>	911	911	98%	0.0	100%	<a href="#">GU324146.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Metapenaeus affinis voucher DAAPV F7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; r</a>	898	898	98%	0.0	99%	<a href="#">GU324140.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Litopenaeus vannamei 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial gen</a>	896	896	97%	0.0	100%	<a href="#">AY264914.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Litopenaeus vannamei clone 100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochr</a>	889	889	96%	0.0	100%	<a href="#">AY344181.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Litopenaeus vannamei clone 280 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochr</a>	889	889	96%	0.0	100%	<a href="#">AY344184.1</a>

شکل ۱۳: بلاست کردن توالی مربوط به میگوهای های‌هلت نسل صفر در سایت جهانی ژن

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

	Alignments	Download	GenBank	Graphics	Distance tree of results							
	Description						Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Litopenaeus vannamei mitochondrion complete genome</a>						909	909	100%	0.0	99%	<a href="#">KT596762.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Litopenaeus vannamei mitochondrion complete genome</a>						909	909	100%	0.0	99%	<a href="#">DQ534543.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Litopenaeus vannamei mitochondrion complete genome</a>						909	909	100%	0.0	99%	<a href="#">EF584003.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Litopenaeus vannamei 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; rRNA-Vai gene, con</a>						909	909	100%	0.0	99%	<a href="#">AY046914.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Penaeus vannamei 16S rRNA gene</a>						909	909	100%	0.0	99%	<a href="#">AJ132780.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Litopenaeus vannamei voucher DAAPV F14 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc</a>						896	896	98%	0.0	99%	<a href="#">GU324146.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Metapenaeus affinis voucher DAAPV F7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mi</a>						883	883	98%	0.0	99%	<a href="#">GU324140.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Litopenaeus vannamei 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial gene</a>						881	881	96%	0.0	99%	<a href="#">AY254914.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Litopenaeus vannamei clone 100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochor</a>						874	874	96%	0.0	99%	<a href="#">AY344181.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Litopenaeus vannamei clone 280 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochor</a>						874	874	96%	0.0	99%	<a href="#">AY344184.1</a>

شکل ۱۴: بلاست کردن توالی مربوط به میگوهای مولوکائی نسل صفر در سایت جهانی ژن

از سوی دیگر با توجه به اینکه میگوهای مولوکائی × های هلث (نسل دوم) از میگوهای مولوکائی × های هلث (نسل اول) منتج شده بودند لذا بررسی میزان یکسانی آنها حاکی از آن بود که بیش از ۹۹ درصد شباهت میان آنها وجود دارد (شکل ۱۵).

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Molokaei 00Y High Health (F1)</a>	891	891	97%	0.0	99%	Query_54379

Molokaei × High Health (F1) with High Health × Molokaei (F2)

Sequence ID: Query\_54379 Length: 488 Number of Matches: 1

Range 1: 3 to 488	Graphics	Next Match	Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps
891 bits(482)	0.0	484/486(99%)	0/486(0%)
Strand	Plus/Plus		
Query 1	ACATGCTATATGATTGGTATGTAAAGTCTGGCCTGCCACTGATTTATTTAAAGGCC	68	
Subjct 3	ACATGCTATATGATTGGTATGTAAAGTCTGGCCTGCCACTGATTTATTTAAAGGCC	62	
Query 61	GCGGTAACTGACCGTCCGAAGGTAGCATAATCATTAGTCTTTAAATGGAGGCTGAT	128	
Subjct 63	GCGGTAACTGACCGTCCGAAGGTAGCATAATCATTAGTCTTTAAATGGAGGCTGAT	122	
Query 121	GAATGGTTGGACAAAAGCAAACTGTCTCAATTATTTATTGAATTTAACTTTAAGTG	188	
Subjct 123	GAATGGTTGGACAAAAGCAAACTGTCTCAATTATTTATTGAATTTAACTTTAAGTG	182	
Query 181	AAAGGCTTAAATAAATTAAAGGGACGATAAGACCTATAAAGCTTTACAATAAGTACC	248	
Subjct 183	AAAGGCTTAAATAAATTAAAGGGACGATAAGACCTATAAAGCTTTACAATAAGTACC	242	
Query 241	TATATTATAAATTGTTAGTATAACTTGAGTTAGGTAACGTTTGTTCGCTTGGGGCAGC	308	
Subjct 243	TATATTATAAATTGTTAGTATAACTTGAGTTAGGTAACGTTTGTTCGCTTGGGGCAGC	302	
Query 361	AGAATATAAAGTAACTGTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAAATTTCTGGAAAATAAT	368	
Subjct 363	AGAATATAAAGTAACTGTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAAATTTCTGGAAAATAAT	362	
Query 421	GATCCTCTACTAGAGATCATAAGATTAAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATCTCTTT	428	
Subjct 423	GATCCTCTACTAGAGATCATAAGATTAAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATCTCTTT	422	
Query 481	GAGAGTCCACATCGACAGGAGGGTTGGACCTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTATAAA	488	
Subjct 483	GAGAGTCCACATCGACAGGAGGGTTGGACCTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTATAAA	482	

شکل ۱۵: شباهت نوکلئوتیدی میان میگوهای مولوکائی × های هلث (نسل دوم) با میگوهای مولوکائی × های هلث (نسل اول)

این در حالی بود که مقایسه یکسانی میگوهای مولوکائی ×های هلث (نسل دوم) با میگوهای مولوکائی (نسل صفر) با استفاده از نرم افزار Nucleotide BLAST حاکی از آن بود که ۱۰۰ درصد شباهت ژنی میان آنها وجود دارد (شکل ۱۶).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">High Health (F0)</a>	898	898	97%	0.0	100%	Query_164569

Molokaei (F0) with High Health × Molokaei (F2)

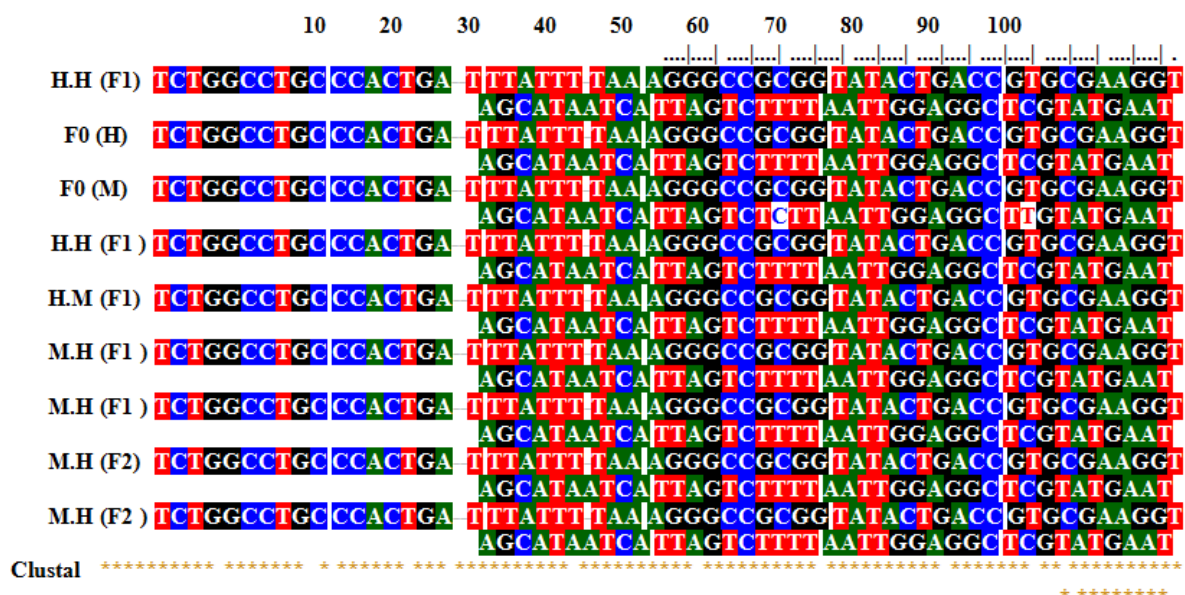
Sequence ID: Query\_164569 Length: 498 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
898 bits(486)	0.0	486/486(100%)	0/486(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACATGCTATATGATTGGTATGTAAGTCTGGCCTGCCCACTGATTTATTTAAAGGGCC	60		
Sbjct 2	ACATGCTATATGATTGGTATGTAAGTCTGGCCTGCCCACTGATTTATTTAAAGGGCC	61		
Query 61	GCGGTACTGACCGTGCAGAGGTAGCATAATCATTAGTCTTTAATTGGAGGCTCGTAT	120		
Sbjct 62	GCGGTACTGACCGTGCAGAGGTAGCATAATCATTAGTCTTTAATTGGAGGCTCGTAT	121		
Query 121	GAATGGTTGGACAAAAGCAAACGTCTCAATTATATTTATTGAATTAACCTTTAAGTG	180		
Sbjct 122	GAATGGTTGGACAAAAGCAAACGTCTCAATTATATTTATTGAATTAACCTTTAAGTG	181		
Query 181	AAAAGGCTTAAATAAATTAAGGGGACGATAAGACCCTATAAAGCTTACAATAAGTTACC	240		
Sbjct 182	AAAAGGCTTAAATAAATTAAGGGGACGATAAGACCCTATAAAGCTTACAATAAGTTACC	241		
Query 241	TATATTATAAATTGTTAGTATAAAGTTAGGTAACGTTTGTGCGTTGGGGCGACG	300		
Sbjct 242	TATATTATAAATTGTTAGTATAAAGTTAGGTAACGTTTGTGCGTTGGGGCGACG	301		
Query 301	AGAAATAAATAAGTAACTGTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAAATTTCTGGAAAAATAAT	360		
Sbjct 302	AGAAATAAATAAGTAACTGTTCTTAAGTTATTTAATGACAGAAATTTCTGGAAAAATAAT	361		
Query 361	GATCCTCTACTAGAGATCATAAGATTAAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATCTTCTTT	420		
Sbjct 362	GATCCTCTACTAGAGATCATAAGATTAAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATCTTCTTT	421		
Query 421	GAGAGTCCACATCGACAGGAAGGGTTCGACCTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTTATAA	480		
Sbjct 422	GAGAGTCCACATCGACAGGAAGGGTTCGACCTCGATGTTGAATTAAGGGTTCCTTATAA	481		
Query 481	TGCAGC 486			
Sbjct 482	TGCAGC 487			

شکل ۱۶: شباهت نوکلئوتیدی میان میگوهای مولوکائی ×های هلث (نسل دوم) با میگوهای مولوکائی (نسل صفر)

۳-۳- همردیفی توالی‌های ناحیه 16S rRNA نسل‌های مختلف میگو

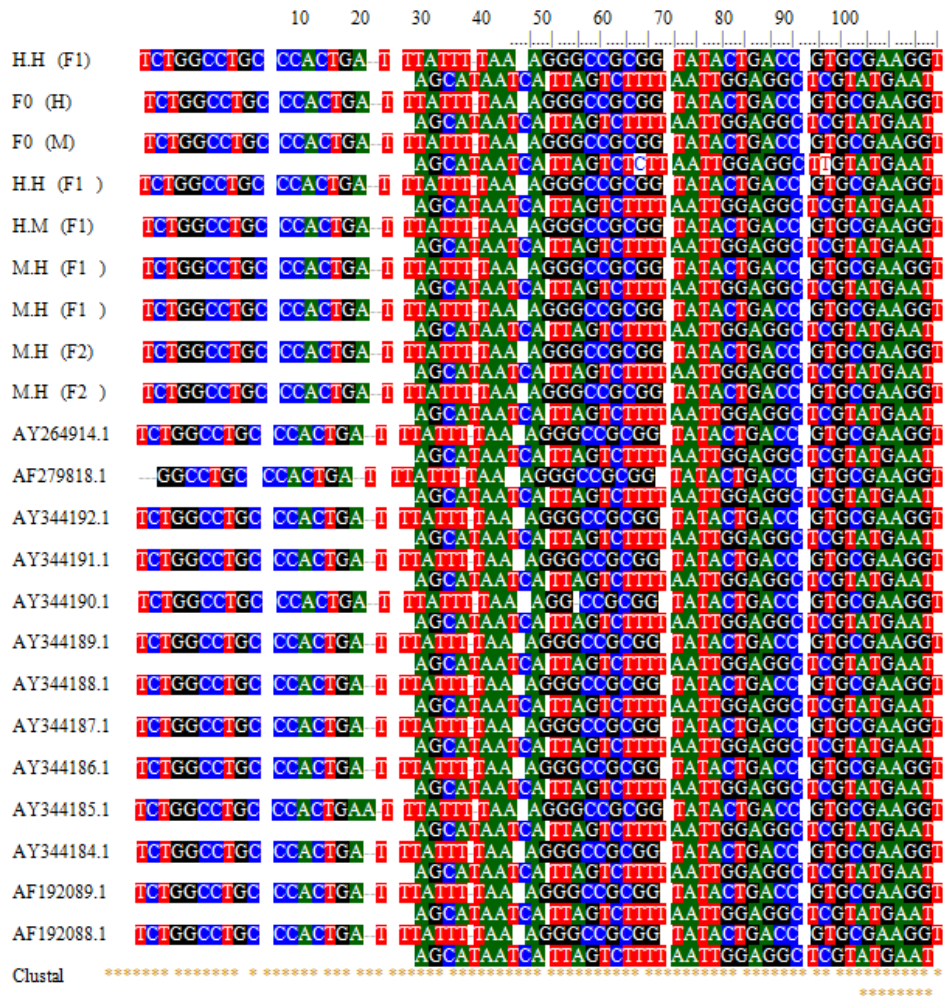
نتایج حاصل از هم ردیف نمودن توالی‌های مربوط به نسل‌های مختلف میگوی عاری از بیماری خاص در این مطالعه حاکی از آن بود که توالی‌های مربوط به نسل‌های مختلف میگو کاملاً با همدیگر مشابه می‌باشند و هیچگونه اختلافی در میان آنها مشاهده نمی‌شود (شکل ۱۷).



شکل ۱۷: هم‌ردیفی توالی‌های نوکلئوتیدی نسل‌های مختلف میگو و شباهت میان آنها

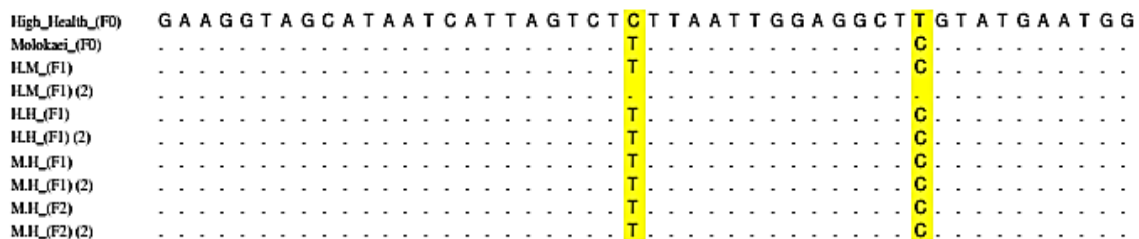
#### ۳-۴- هم‌ردیفی اولیه توالی‌های ناحیه 16S rRNA نسل‌های مختلف میگو با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن

با توجه به نتایج بدست آمده مشاهده شد که توالی‌های مربوط به نسل‌های مختلف میگو در برخی از مناطق ژنوم 16S rRNA با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن متفاوت هستند. لیکن این تفاوت در شماره‌های ژنی AY344186.1 و AY344188.1، AY344190.1، AY344192.1، AY344185.1، AF279818.1 بسیار ناچیز بود (شکل



شکل ۱۸: هم‌ردیفی توالی‌های نوکلئوتیدی نسل‌های مختلف میگو و توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن و شباهت میان آنها

۵-۳- ترکیب نوکلئوتیدی حاصله از هم‌ردیفی توالی‌های ناحیه 16S rRNA نسل‌های مختلف میگو با توجه به هم‌ردیفی توالی‌های مربوط به نسل‌های مختلف میگو نتایج حاصل از مطالعه حاکی از آن بود که از بین ۴۸۶ جایگاه، ۴۸۴ جایگاه حفاظت شده و ۲ جایگاه متغیر وجود دارد که در هر دو جایگاه اطلاعات فیلوژنتیک در شرایط پارسیمونی گنجانده شده بود و هیچ جایگاه سینگلتونی وجود نداشت (شکل ۱۹).



شکل ۱۹: مناطق محافظت شده و متغیر در توالی‌های مربوط به نسل‌های مختلف میگو

همچنین بررسی ترکیب بازی در تاحیه 16S rRNA حاکی از آن بود که توالی این ناحیه غنی از AT به میزان ۶۵-۶۵/۲ درصد بود که متوسط محتوی آن ۶۵/۱ درصد می‌باشد. همچنین متوسط محتوی بازی این توالی شامل ۳۲/۷، ۱۴/۰، ۳۲/۳ و ۲۱/۰ درصد به ترتیب برای بازهای T، C، A و G می‌باشد (جدول ۳).

جدول ۳: درصد ترکیب بازی در تاحیه 16S rRNA

جمعیت	T(U) %	C %	A %	G %	AT %	Total
High Health (F0)	32.7	14.0	32.3	21.0	65.0	486.0
Molokaei (F0)	32.7	14.0	32.3	21.0	65.0	486.0
H.M (F1)	32.8	13.8	32.4	21.0	65.2	485.0
H.H (F1)	32.7	14.0	32.3	21.0	65.0	486.0
M.H (F1)	32.6	14.0	32.4	20.9	65.1	484.0
M.H (F2)	32.7	14.0	32.3	21.0	65.0	486.0
Avg.	32.7	14.0	32.3	21.0	65.1	485.6

### ۳-۶- تخمین MCL الگوی جانیشینی نوکلئوتیدی برای بازها

با توجه به اینکه در جدول ۴ عدد، احتمال جانیشینی از یک باز (ردیف) به باز (ستون) دیگر را نشان می‌دهد. لذا برای سادگی کار جمع همه جانیشینی‌ها، معادل ۱۰۰ در نظر گرفته شده است. سرعت‌های متفاوت جانیشینی‌های ترانزیشن بصورت اعداد بولد و جانیشینی‌های ترانسورژن بصورت اعداد ایتالیک نمایش داده شده است. فراوانی نوکلئوتیدها ۳۲/۵۱ برای A، ۳۲/۷۱ درصد برای T، ۱۳/۸۷ درصد برای C و ۲۰/۹۱ درصد برای G محاسبه شد. نسبت ترانزیشن به ترانسورژن برای پورین‌ها ( $K_1$ ) و برای پیریمیدین‌ها ( $K_2$ ) به ترتیب معادل با ۱ و ۱۰۰۰ تخمین زده شده است. گرایش ترانزیشن به ترانسورژن سرتاسری نیز معادل با R و ۱۸۲/۶۳۳ محاسبه شد. R به شرح زیر محاسبه می‌شود:

$$R: [A \times G \times K_1 \times T \times C \times K_2] / [(A+G) \times (T+C)]$$

جدول ۴: تخمین MCL الگوی جانیشینی نوکلئوتیدی برای بازها

Maximum Composite Likelihood Estimate of the Pattern of Nucleotide Substitution				
	A	T	C	G
A	-	0.07	0.03	<b>0.04</b>
T	0.07	-	<b>29.62</b>	0.04
C	0.07	<b>69.84</b>	-	0.04
G	<b>0.07</b>	0.07	0.03	-

### ۳-۷- شاخص‌های ژنتیکی نسل‌های مختلف میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص

تجزیه و تحلیل ۴۸۶ جفت باز توالی 16S rRNA ژنوم میتوکندری نسل‌های مختلف میگوی سفید غربی با استفاده از نرم افزار DnaSP نشان داد که تعداد هاپلو تیپ‌های شناسایی شده در میان نسل‌های مختلف میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص در دامنه ۳-۶ عدد وجود داشت. این در حالی بود که میزان پلی مورف شدن جایگاه‌ها در

دامنه ۲۳۱-۱۹۸ بود (جدول ۵). این در حالی بود که میزان جریان ژنی و تمایز ژنی میان نسل‌های مختلف میگو به ترتیب ۲/۰۰- و ۰/۱۴۲- بود.

جدول ۵: میزان شاخص‌های ژنتیکی نسل‌های مختلف میگوی عاری از بیماری خاص

نسل‌های مختلف میگو						پارامتر
M.H (F2)	M.H (F1)	H.M (F1)	H.H (F1)	M (F0)	H (F0)	
۴۸۶	۴۸۶	۴۸۶	۴۸۶	۴۸۶	۴۸۶	تعداد جایگاه مورد بررسی
۱	۱	۲	۱	۱	۱	تعداد هاپلوتیپ
۰	۰	۲	۰	۰	۰	تعداد پلی‌مورف
۴۸۶	۴۸۴	۴۸۲	۴۸۶	۴۸۶	۴۸۶	تعداد مونومورف
۰	۰	۲	۰	۰	۰	سینگلتون
۰	۰	۰	۰	۰	۰	پارسیمون
۰/۰۰۰±۰/۰۰۰	۰/۰۰۰±۰/۰۰۰	۱/۰۰±۰/۵۰	۰/۰۰۰±۰/۰۰۰	۰/۰۰۰±۰/۰۰۰	۰/۰۰۰±۰/۰۰۰	تنوع هاپلوتیپی
%۰/۰۰۰	%۰/۰۰۰	%۰/۰۴۴۱۳	%۰/۰۰۰	%۰/۰۰۰	%۰/۰۰۰	تنوع نوکلئوتیدی
۱/۰۰	۱/۰۰	۰/۹۸۷	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	هموزیگوسیتی

H: High Health, M: Molokaei, H.H: High Health×High health, H.M: High Health×Molokaei, M.H: Molokaei× High Health.

### ۸-۳- آنالیز فیلوژنتیک توالی 16S rRNA میتوکندریال نسل‌های مختلف میگو

نتایج حاصل از بررسی آنالیز فیلوژنتیک ماتریکس فاصله ژنتیکی حاکی از یکسانی بسیار قابل توجه نسل‌های مختلف میگو بود بطوریکه نمونه‌ها با همدیگر بیش از ۹۹ درصد شباهت داشتند. این در حالی بود که بیشترین تفاوت میان میگوهای نسل صفر جمعیت مولوکائی و های‌هلت ۰/۰۰۴ محاسبه شد. کمترین اختلاف مشاهده شده میان میگوهای نسل اول و دوم با میگوهای نسل صفر بود (جدول ۶).

جدول ۶: فاصله ژنتیکی میان نسل‌های مختلف میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص

در بررسی توالی منطقه 16S rRNA میتوکندریال

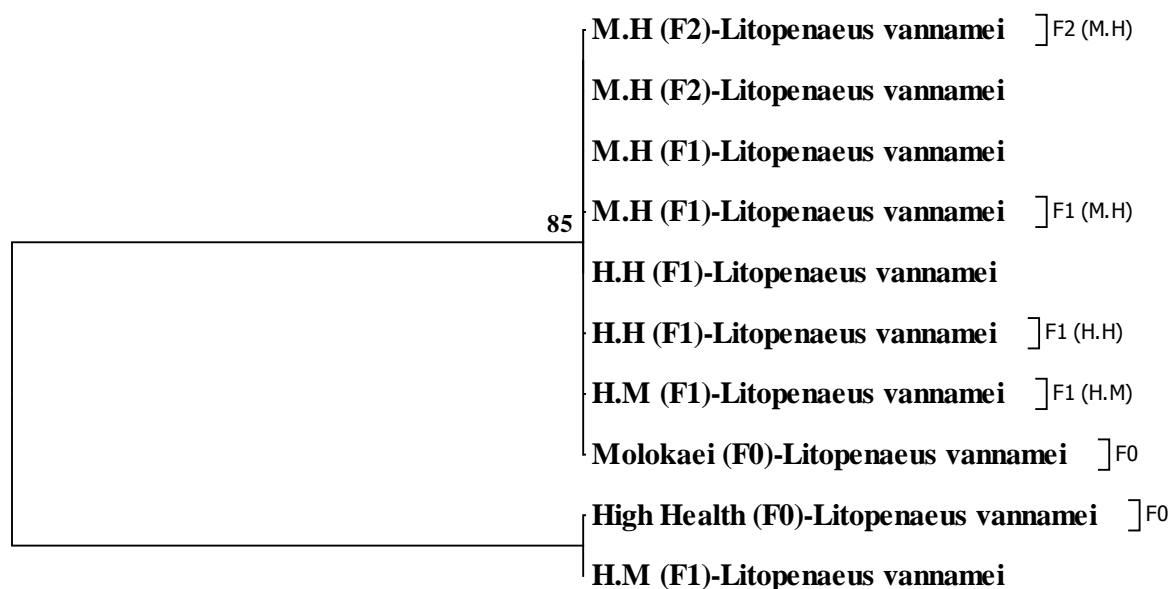
	1	2	3	4	5	6
1. High_Health_(F0)		0.003	0.001	0.003	0.003	0.003
2. Molokaei_(F0)	0.004		0.001	0.000	0.000	0.000
3. H.M_(F1)	0.002	0.002		0.001	0.001	0.001
4. H.H_(F1)	0.004	0.000	0.002		0.000	0.000
5. M.H_(F1)	0.004	0.000	0.002	0.000		0.000
6. M.H_(F2)	0.004	0.000	0.002	0.000	0.000	

همچنین مقایسه میان توالی نسل‌های مختلف میگوی عاری از بیماری خاص با توالی ثبت شده در بانک جهانی ژن حاکی از آن بود که میزان فاصله ژنتیکی میان میگوهای های‌هلت (نسل صفر) و های‌هلت × مولوکائی (نسل اول) ۰/۰۰۴ می‌باشد (جدول ۷).

جدول ۷: فاصله ژنتیکی میان نسل‌های مختلف میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. High_Health_(F0)		0.003	0.000	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
2. Molokaei_(F0)	0.004		0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3. H.M_(F1)	0.000	0.004		0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
4. H.H_(F1)	0.004	0.000	0.004		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5. M.H_(F1)	0.004	0.000	0.004	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6. M.H_(F2)	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7. AY264914.1	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
8. AF279818.1	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
9. AY344192.1	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000
10. AY344191.1	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000
11. AY344190.1	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

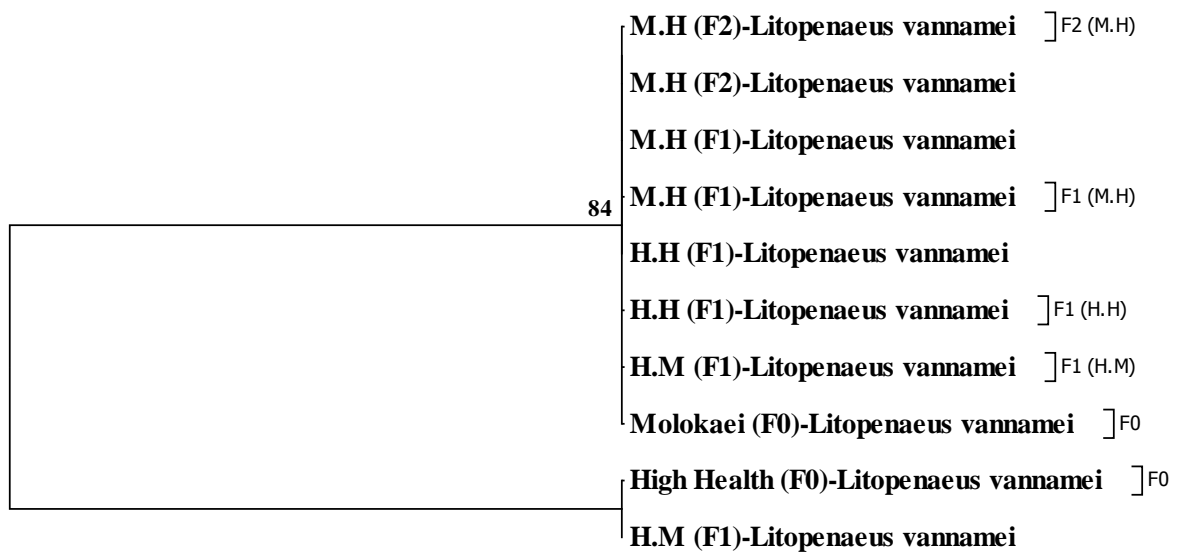
نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیک نمونه‌ها بر اساس الگوریتم‌های Neighbor-Joining و BioNJ حاکی از آن بود که به دلیل شباهت بالای میگوهای نسل‌های مختلف میگوی عاری از بیماری خاص به ترتیب ۸۵ و ۸۴ درصد است و که هیچگونه تفاوتی میان نمونه‌ها مشاهده نشد (نمودارهای ۳ و ۴).



نمودار ۳: آنالیز فیلوژنتیک منطقه 16S rRNA میتوکندریال نسل‌های مختلف میگوی سفید غربی عاری از



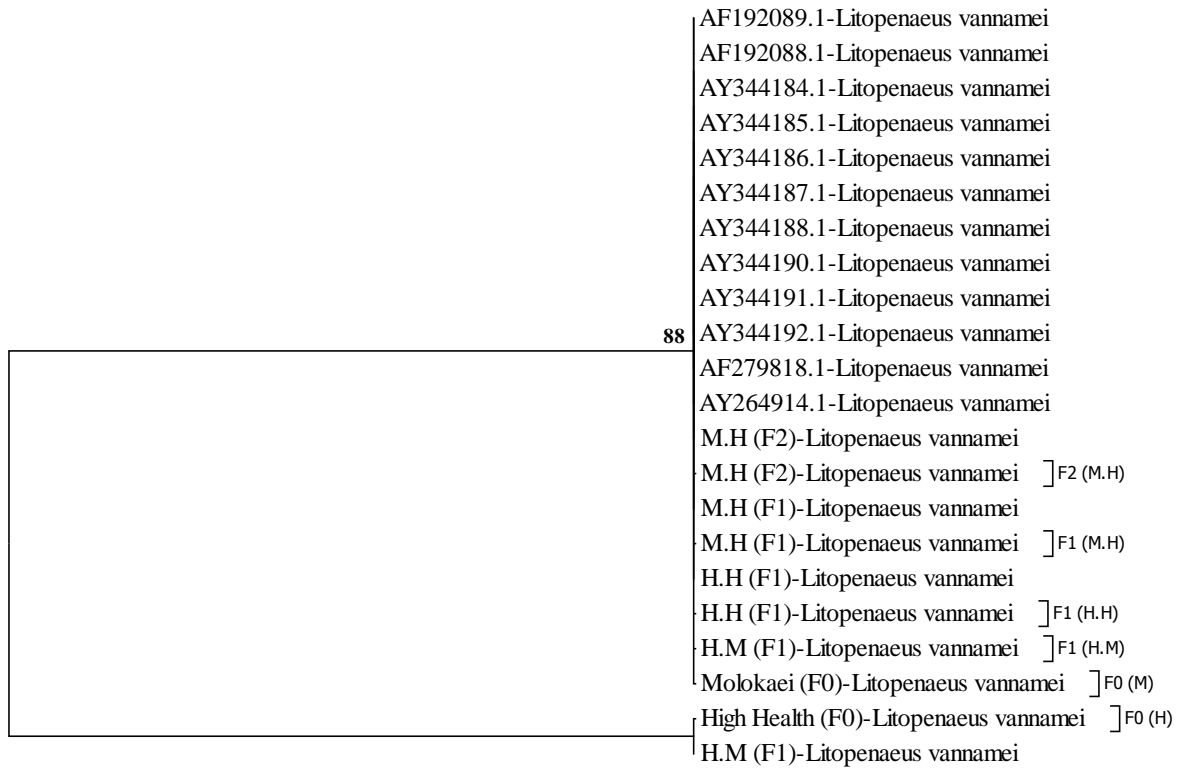
بیماری خاص براساس الگوریتم Neighbor-Joining



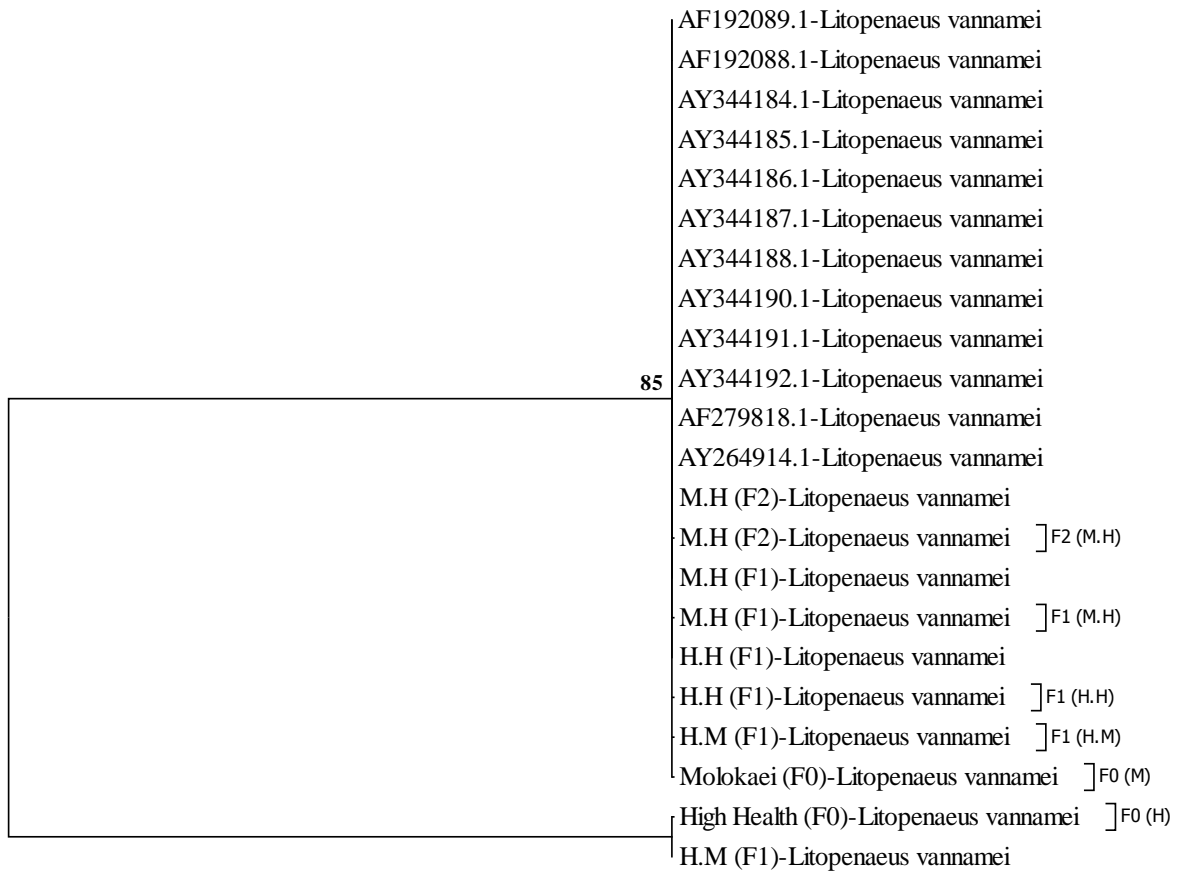
نمودار ۴: آنالیز فیلوژنتیک منطقه 16S rRNA میتوکندریال نسل‌های مختلف میگوی سفید غربی عاری از

بیماری خاص براساس الگوریتم BioNJ

همچنین نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیک نمونه‌ها بر اساس الگوریتم‌های Neighbor-Joining و BioNJ در مقایسه با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن حاکی از آن عدم وجود اختلاف و شباهت بالای میگوهای عاری از بیماری خاص با سایر توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن بود (نمودار های ۵ و ۶).



نمودار ۵: آنالیز فیلوژنتیک منطقه 16S rRNA میتوکندریال نسل‌های مختلف میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص در مقایسه با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن براساس الگوریتم Neighbor-Joining



نمودار ۶: آنالیز فیلوژنتیک منطقه 16S rRNA میتوکندریال نسل‌های مختلف میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص در مقایسه با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن براساس الگوریتم BioNJ

#### ۴- بحث

در مطالعه حاضر از ژن 16s rRNA میتوکندریایی برای بررسی تفاوت‌های ژنتیکی نسل‌های مختلف میگوی عاری بیماری خاص استفاده شد. توالی یابی این ژن اطلاعات مفیدی در خصوص شاخص‌های ژنتیکی نسل‌های مختلف میگوی عاری از بیماری خاص ارائه داد. تمام DNA های استخراج شده دارای کیفیت و کمیت قابل قبولی برای انجام واکنش PCR بودند، بطوریکه تمامی محصول PCR بر روی ژل بدون هیچگونه آلودگی پروتئنی و یا باند اضافه مشاهده شدند.

با توجه به نتایج بدست آمده از ردیف سازی توالی‌های ژن 16S rRNA حاصل از مطالعه مذکور از ۴۸۶ جفت باز ردیف سازی شده تمامی توالی‌یابی‌های فاقد هر گونه موارد حذف یا اضافه شدن بودند. از این رو از ۴۸۶ جایگاه ردیف سازی شده از توالی ژن 16S rRNA، ۴۸۶ جایگاه ردیف سازی شده از توالی ژن 16S rRNA، ۴۸۴ جایگاه حفاظت شده وجود داشت که از این تعداد ۲ جایگاه متغیر وجود داشت که در هر دو جایگاه اطلاعات فیلوژنتیک در شرایط پارسیمونی گنجانده شده بود و هیچ جایگاه سینگلتونی وجود نداشت. همچنین در بین نسل‌های مختلف میگو عاری از بیماری خاص تنها ۲ جایگاه دچار جهش شده بودند که این میزان بیانگر نرخ اندک جهش در این منطقه از ژنوم میتوکندری نسل‌های مختلف میگو می‌باشد. از سوی دیگر تعداد هاپلو تیپ‌های و جایگاه‌های پلی مورف مشاهده شده در تمامی نمونه‌های مربوط به نسل‌های مختلف میگو تنها ۲ عدد بود. این در حالی بود که میزان تنوع هاپلو تیپی و تنوع نوکلئوتیدی به ترتیب  $0/00147$  و  $0/356 \pm 0/159$  محاسبه شد، که این میزان حاکی از پائین بودن میزان تنوع نوکلئوتیدی در نسل‌های مختلف میگوی می‌باشد از این رو مقدار اندک این شاخص با سایر مقادیر تنوع ژنتیکی بدست آمده مطابقت دارد.

در این رابطه شهرانی کرانی و همکاران (۱۳۹۴) در بررسی تنوع ژنتیکی میگوی سر تیز (*Metapenaeus affinis*) در خلیج فارس بر اساس توالی ژن میتوکندریایی 16S rRNA عنوان نمودند که میانگین تنوع هاپلو تیپی بین سه منطقه بندرعباس، بوشهر و آبادان  $0/608 \pm 0/007$  و میانگین تنوع نوکلئوتیدی  $0/003 \pm 0/002$  محاسبه شد. نتایج بیانگر متوسط بودن میزان تنوع هاپلو تیپی و کم بودن میزان تنوع نوکلئوتیدی در میگوهای جمع آوری شده از مناطق مورد مطالعه بود.

این در حالی بود که مقایسه نتایج مطالعه حاضر، با نتایج بررسی تنوع ژنتیکی میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) با توالی یابی ژن 16S rRNA در خوریات لافت و سیرک استان هرمزگان حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بالا در میگوهای این منطقه نسبت به تنوع ژنتیکی پائین مشاهده شد در نسل‌های مختلف میگوی عاری از بیماری خاص بود (سوری نژاد و همکاران، ۱۳۹۳). از این رو نتایج بدست آمده نشان داد که ژن 16S rRNA میتوکندریایی در میگوهای پرورشی نسل‌های مختلف میگوی عاری از بیماری خاص به شدت محافظت شده بود، به گونه‌ای که میزان تنوع ژنتیکی و نوکلئوتیدی به شدت کاهش یافته بود. در نتیجه می‌توان عنوان نمود که به دلیل نگهداری میگوهای سفید غربی پرورشی تحت اسارات و غیربومی بودن آنها و همچنین عدم دسترسی به

مولدین وحشی به دلیل افزایش جریان‌های ژنی میان نسل‌های مختلف مقادیر تنوع ژنی به شدت کاهش یافته بود. از سوی دیگر بررسی فاصله ژنتیکی میان نسل‌های مختلف میگوی عاری از بیماری خاص حاکی از فاصله ژنتیکی بسیار کم میان نسل‌های مختلف میگو بود که ممکن است به دلیل حفاظت بالای جایگاه‌های موجود در منطقه 16S rRNA و تکامل کم آن باشد. شایان ذکر است که ایجاد تنوع در این منطقه قادر است در تبعیض میان گونه‌ها نسبت به درون گونه به میزان دقیق تری عمل می‌کند و توالی پیدا شده در منطقه 16S rRNA قادر است هاپلو تیپ‌های یک گونه را شناسایی نماید (Meyer, 1994). در این رابطه Maggioni و همکاران (۲۰۰۱) با استفاده از ژنوم منطقه 16S rRNA عنوان نمودند که میگوی *F. subtilis* می‌تواند الگوی ژنتیکی متفاوتی نسبت به سایر گونه‌ها داشته باشد. در مقابل جایگاه ژنوم میتوکندری در منطقه 16S rRNA، بررسی ژنوم منطقه سیتوکروم اکسیداز I (COI) قابلیت بیشتری در تعیین تمایز ژنتیکی و تفاوت ژنتیکی میگوها می‌تواند ایفاد کند. بطوریکه این توالی‌های قادرند تنوع نوکلئوتیدی کافی را بمنظور تعیین هاپلو تیپ ایجاد شده در هر مولد نشان دهند. در این رابطه Grijalva-Chon و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از ژنوم منطقه سیتوکروم اکسیداز برای *F. subtilis*، ۸ جایگاه متنوع شناسایی نمودند این در حالی بود در مقایسه صورت گرفته میان این میگوی *F. subtilis* با میگوی سفید غربی ۷۰ جایگاه متفاوت شناسایی شد. در واقع نرخ جایگزینی ارائه شده توسط ژن COI تا حدودی بالاتر می‌باشد، که این امر می‌تواند منجر به تشخیص تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف از یک گونه یکسان شود (Gusmão et al., 2000).

از سوی دیگر به دلیل کم بودن فاصله ژنتیکی میان نسل‌های مختلف میگو بررسی درخت فیلوژنتیک بر اساس دو الگوریتم Neighbor-Joining و BioNJ نشان داد که میگوهای حاصل از آمیزش میگوهای های هلث و مولو کائی شباهت بالایی با میگوهای های هلث نسل صفر دارند. این در حالی بود که دیگر نسل‌های میگو در یک شاخه قرار می‌گرفتند (سپرهم و همکاران، ۱۳۹۲).

در این رابطه Gusmão و همکاران (۲۰۰۰) عنوان نمودند که به دلیل فاصله ژنتیکی کم برای پنج مولد میگوی سفید غربی (۱-۲/۰ درصد) شباهت زیادی بین آنها وجود دارد. لذا مطلب فوق می‌تواند تأیید کننده نتایج بدست آمده از این تحقیق باشد. این در حالی است که بررسی برخی از گونه‌های پنائیده توسط توالی ژنوم COI فواصل ژنتیکی میان نمونه‌های مختلف میگو را بخوبی نشان داد، آنها عنوان نمودند که این حالت ناشی از عدم وجود مناطق غیر محافظت شده در ژنوم منطقه سیتوکروم اکسیداز است، به گونه‌ای که میانگین فاصله ژنتیکی بین میگوی سفید غربی و گونه *F. subtilis* ۱۰/۹۴ درصد بود که نزدیک به ۸/۱ درصد فاصله ژنتیکی بدست آمده توسط Gusmão و همکاران (۲۰۰۰) برای گونه‌های *Farfantepenaeus paulensis* and *F. subtilis* را شامل می‌شد (Grijalva-Chon et al., 2013).

همچنین عنوان شده که احتمال دارد که وجود مقادیر کم فاصله ژنتیکی بین نسل‌های مختلف میگو ناشی از جهش‌هایی باشد که در زمان تشکیل آنها رخ داده باشد و یا ممکن است به رانش ژنتیکی تصادفی و یا اثرات

بنیانگذار مرتبط باشد. از آنجا که ژنوم میتوکندری مادری بدون نوترکیبی به ارث می‌رسد انتظار می‌رود که این ژنوم بسیار مستعد ابتلا به حوادث تصادفی همانند رانش ژنتیکی باشد (Bembo et al., 1995).

از آنجا که تراز تنوع هاپلو تیبی می‌تواند از صفر (تمام افراد جمعیت دارای هاپلو تیبی یکسان) تا یک (تمام افراد جمعیت دارای هاپلو تیب متفاوت) متغیر باشد. لیکن Cui و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه مشابه صورت گرفته در میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) (Benzie et al., 2002)، میگوی سفید غربی (Valles-Jimenez et al., 2006)، میگوی *Litopenaeus setiferus* (McMillen-Jackson & Bert, 2004) *Farfantepenaeus duorarum* (McMillen-Jackson & Bert, 2003) میزان تنوع هاپلو تیبی ژنوم میتوکندریایی در سطوح متوسط تا بالا گزارش شد، این در حالی بود که این میزان در میگوی چینی (*Fenneropenaeus chinensis*) در شمال غرب اقیانوس آرام در سطح پائینی (۰/۲۴) در میگوی چینی بود (Kong et al., 2010).

بطور کلی میزان تنوع هاپلو تیبی متوسط تا بالا برای گونه‌های دریایی و به ویژه راسته ده پایان به بزرگ بودن اندازه جمعیت و پراکندگی گسترده در فواصل زیاد نسبت داده می‌شود که در نهایت به نگهداری بسیاری از هاپلو تیب‌های منحصر به فرد در طول رشد و پراکنش جمعیت منجر می‌گردد (Bucklin & Wiebe, 1998; Zardoya et al., 2004). از سوی دیگر اندازه جمعیت مؤثر ممکن است در تواحی مختلف جغرافیایی که پراکنش گونه جریان دارد به دلیل فرآیند پویایی جمعیت در طول تاریخ تغییر کند که این میزان در سطوح تنوع ژنتیکی نیز دستخوش تغییراتی می‌شود. علاوه بر این، پویایی تکاملی (جهش، رانش ژنتیکی، انتخاب طبیعی) که در سطوح مختلف بر موجود تأثیر می‌گذارند نیز ممکن است باعث بروز الگوهای متفاوت تنوع ژنتیکی شوند (De Croos & Palsson, 2010). از دیگر عوامل دخیل در عدم ایجاد تفاوت در تنوع ژنتیکی نسل‌های مختلف میگوهای سفید غربی عاری از بیماری خاص ممکن است ناشی از عدم وجود جدای‌های جغرافیایی و عدم وجود فاصله مکانی بین ذخائر مختلف باشد (Wang et al., 2008). عنوان شده که با افزایش فاصله جغرافیایی، فاصله ژنتیکی نیز افزایش خواهد یافت که علت آن ناشی از کاهش جریان‌های ژنی در اثر وجود موانع فیزیکی و یا طبیعی است (Beacham et al., 2004). اصولاً اختلاف ژنتیکی بین جمعیت‌ها در نتیجه مجتمع شدن افراد در یک منطقه به وجود می‌آید و جمعیت‌های یک گونه به واسطه آمیزش درونی با یکدیگر یک مخزن ژنی منحصر به همان جمعیت را ایجاد می‌کنند (Piñera et al., 2007). بنابراین با توجه به نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد جابجایی و تبادل جریان ژنی بیشتری بین نسل‌های مختلف میگوی عاری از بیماری خاص وجود داشته است.

از این رو نتایج مطالعه حاضر اولین بررسی در مورد تنوع ژنتیکی و رابطه خویشاوندی نسل‌های مختلف میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص با استفاده از توالی یابی ژنوم میتوکندریایی در منطقه 16S rRNA نشان داد که نشانگرهای مولکولی به ویژه نشانگرهای میتوکندریایی می‌توانند بصورت ابزاری مناسب در جهت بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های آبریان از جمله میگوی سفید غربی مورد استفاده قرار گیرند. همچنین از این گونه نشانگرها می‌توان در گونه‌هایی با خویشاوندی نزدیک و با جد و نیای مشترک به راحتی استفاده کرد. در این

مطالعه مشخص شد که میزان تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی کمی در میان نسل‌های مختلف میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص وجود دارد. از سوی دیگر با توجه به اینکه تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، عاملی مهم و اساسی در تکامل و حفاظت زیستی آنها است، سطوح بالای تنوع ژنتیکی منجر به افزایش توانایی افراد جمعیت در پاسخ انتخاب طبیعی و افزایش بازماندگی آنها خواهد داد (Beacham *et al.*, 2004).

## ۵- نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه و سایر مطالعات صورت گرفته در این خصوص اینگونه می‌توان عنوان نمود که ژنوم 16SrRNA میتوکندریایی استفاده شده در این مطالعه در مقایسه با سایر نشانگرهای میتوکندریایی از قبیل منطقه COI و d-loop به دلیل وجود مناطق حافظت شده در این منطقه از ژنوم و کوچک بودن طول این ناحیه از سرعت تکاملی پائین تری برخوردار می‌باشد. از این رو ژنوم این منطقه قادر نیست که تفاوت‌های ژنتیکی میان نسل‌های مختلف یک گونه را نشان دهد. لیکن تنها کاربرد این نشانگر تعیین روابط فیلوژنتیک میان گونه‌های مختلف میگوهای خانواده پنائیده با همدیگر یا با سایر موجودات است. بنابراین با توجه به وجود مناطق محافظت شده کمتر در سایر مناطق ژنوم میتوکندریایی همانند منطقه COI و d-loop توصیه می‌گردد که جهت تعیین تفاوت‌های ژنتیکی میان نسل‌های مختلف میگو بصورت درون گونه‌ای از ژنوم‌های فوق استفاده گردد و یا اینکه از روش میکروستلایت جهت تعیین تفاوت‌های ژنتیکی، تنوع ژنتیکی و هتروزیگوسیتی در نسل‌های مختلف استفاده گردد.



## منابع

- ۱- رهنما، ر.، حسینی، س. ج.، قاسمی، س. ا.، یاوری، و.، ذوالقرنین ح. ۱۳۹۰. مقایسه مولکولی اولیه *P.(penaeus) semisulcatus persicus* خلیج فارس و زیرگونه آن *P.(penaeus) semisulcatus persicus* با استفاده از 16S rRNA میتوکندریایی. ژنتیک نوین. ۶ (۲). ۲۳-۳۱.
- ۲- سپرهم، م.، حسینی، س. ج. و هاشم‌نیا، ص. ۱۳۹۲. مقایسه مولکولی میگوی *Penaeus semisulcatus* و زیرگونه آن *P.semisulcatus persicus* با استفاده از ITS-I به عنوان نشانگر ژنومیک و 16S rRNA/tRNA val به عنوان نشانگر میتوکندریایی. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی گرایش سلولی و مولکولی. ۱۰۲ ص.
- ۳- سلحشور، پ.، اصغرزاده، م.، محمدحسینی، ع. ۱۳۸۴. بررسی پلی مورفیسم DNA میتوکندریایی در قوم آذری به روش PCR - RFLP. مجله علوم پایه پزشکی ایران. ۸ (۴)، ۲۲۶-۲۳۱.
- ۴- سوری نژاد، ا.، کشاورزی، ف.، تمدنی جهرمی، س. و وحیدی نژاد، س. ۱۳۹۳. بررسی مقدماتی فیلوژنی و ساختار ژنتیکی میگوی موزی *Fenneropenaeus merguensis* در خوریات لافت و سیرک خلیج فارس با استفاده از توالی یابی ژن میتوکندریایی 16S rRNA. تاکسونومی و بیوسیستماتیک. ۶ (۲۰): ۲۳-۳۶.
- ۵- فریلند، ج. ۱۳۸۹. بوم شناسی مولکولی. مترجم: منصوره ملکیان. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۳۰۴ ص.
- 6- Allegrucci, G., Cesaroni, D., Venanzetti, F., Cataudella, S., Sbordoni, V., 1998. Length variation in mtDNA control region in hatchery stocks of European sea bass subjected to acclimation experiments. *Genetics Selection Evolution* 30, 1.
- 7- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215, 403-410.
- 8- Awadalla, P., Eyre-Walker, A., Smith, J.M., 1999. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science* 286, 2524-2525.
- 9- Baldwin, J.D., Bass, A.L., Bowen, B.W., Clark, W.H., 1998. Molecular Phylogeny and Biogeography of the Marine Shrimp *Penaeus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10, 399-407.
- 10- Ballinger, S.W., Schurr, T.G., Torroni, A., Gan, Y.-Y., Hodge, J.A., Hassan, K., Chen, K.H., Wallace, D.C., 1992. Southeast Asian mitochondrial DNA analysis reveals genetic continuity of ancient mongoloid migrations. *Genetics* 130, 139-152.
- 11- Beacham, T.D., Lapointe, M., Candy, J.R., McIntosh, B., MacConnachie, C., Tabata, A., Kaukinen, K., Deng, L., Miller, K.M., Withler, R.E., 2004. Stock identification of Fraser River sockeye salmon using microsatellites and major histocompatibility complex variation. *Transactions of the American Fisheries Society* 133, 1117-1137.
- 12- Beard, C., Hamm, D., Collins, F., 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect molecular biology* 2, 103-124.
- 13- Bembo, D., Carvalho, G., Snow, M., Cingolani, N., Pitcher, T., 1996. Stock discrimination among European anchovies, *Engraulis encrasicolus*, by means of PCR-amplified mitochondrial DNA analysis. *Oceanographic Literature Review* 12, 1274.
- 14- Benzie, J., Ballment, E., Forbes, A., Demetriades, N., Sugama, K., Moria, S., 2002. Mitochondrial DNA variation in Indo-Pacific populations of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Molecular Ecology* 11, 2553-2569.
- 15- Bucklin, A., Wiebe, P., 1998. Low mitochondrial diversity and small effective population sizes of the copepods *Calanus finmarchicus* and *Nannocalanus minor*: possible impact of climatic variation during recent glaciation. *Journal of Heredity* 89, 383-392.
- 16- Calo-Mata, P., Pascoal, A., Fernández-No, I., Böhme, K., Gallardo, J.M., Barros-Velázquez, J., 2009. Evaluation of a novel 16S rRNA/tRNA Val mitochondrial marker for the identification and phylogenetic analysis of shrimp species belonging to the superfamily Penaeoidea. *Analytical biochemistry* 391, 127-134.
- 17- Chawla, H., 2002. Introduction to plant biotechnology. Science Publishers.

- 18-Cui, Z., Li, C.P., Jang, I.K., Chu, K.H., 2007. Lack of genetic differentiation in the shrimp *Penaeus chinensis* in the northwestern Pacific. *Biochemical genetics* 45, 579-588.
- 19-De Croos, M., Pálsson, S., 2010. Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of white shrimp *Fenneropenaeus indicus* along the coastal belt of Sri Lanka. *Aquatic Living Resources* 23, 315-323.
- 20-FAO, 2014. Fishery and Aquaculture Statistics. Global capture production 1950-2011 (FishstatJ). In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online or CD-ROM]. Rome. Updated.
- 21-Fegan, D., Clifford, H., 2001. Health management for viral diseases in shrimp farms, In: *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture*, pp. 168-198.
- 22-Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 783-791.
- 23-Francisco, A.K.d., Galetti Junior, P.M., 2005. Genetic distance between broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA analyses. *Genetics and Molecular Biology* 28, 258-261.
- 24-Gusmão, J., Lazoski, C., Solé-Cava, A., 2000. A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. *Marine Biology* 137, 435-446.
- 25-Hölzle, U., Chambers, C., Ungar, D., 1991. Optimizing dynamically-typed object-oriented languages with polymorphic inline caches, In: *European Conference on Object-Oriented Programming*, pp. 21-38.
- 26-Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* 16, 111-120.
- 27-Klinbunga, S., Penman, D., McAndrew, B., Tassanakajon, A., 1999. Mitochondrial DNA diversity in three populations of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Marine Biotechnology* 1, 113-121.
- 28-Kong, X.Y., Li, Y.L., Shi, W., Kong, J., 2010. Genetic variation and evolutionary demography of *Fenneropenaeus chinensis* populations, as revealed by the analysis of mitochondrial control region sequences. *Genetics and molecular biology* 33, 379-389.
- 29-Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics* 23, 2947-2948.
- 30-Lotz, J., 1997. Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13, 405-413.
- 31-Maggioni, R., Rogers, A.D., Maclean, N., D'Incao, F., 2001. Molecular phylogeny of western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* shrimp based on mitochondrial 16S partial sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18, 66-73.
- 32-McMillen-Jackson, A.L., Bert, T.M., 2004. Genetic diversity in the mtDNA control region and population structure in the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*. *Journal of Crustacean Biology* 24, 101-109.
- 33-McMillen-Jackson, A.L., Bert, T.M., 2003. Disparate patterns of population genetic structure and population history in two sympatric penaeid shrimp species (*Farfantepenaeus aztecus* and *Litopenaeus setiferus*) in the eastern United States. *Molecular Ecology* 12, 2895-2905.
- 34-Meyer, A., 1994. DNA technology and phylogeny of fish. *Genetics and evolution of aquatic organisms*. Chapman and Hall, London, 219-249.
- 35-Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.
- 36-Nunan, L., Poulos, B., Lightner, D.V., 1998. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture* 160, 19-30.
- 37-Pascoal, A., Barros-Velázquez, J., Cepeda, A., Gallardo, J.M., Calo-Mata, P., 2008a. Survey of the authenticity of prawn and shrimp species in commercial food products by PCR-RFLP analysis of a 16S rRNA/tRNA Val mitochondrial region. *Food chemistry* 109, 638-646.
- 38-Pascoal, A., Barros-Velázquez, J., Cepeda, A., Gallardo, J.M., Calo-Mata, P., 2008b. Identification of shrimp species in raw and processed food products by means of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method targeted to cytochrome b mitochondrial sequences. *Electrophoresis* 29, 3220-3228.
- 39-Perez-Enriquez, R., Hernández-Martínez, F., Cruz, P., 2009. Genetic diversity status of White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* broodstock in Mexico. *Aquaculture* 297, 44-50.
- 40-Piñera, J., Blanco, G., Vázquez, E., Sánchez, J., 2007. Genetic diversity of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) populations off Spanish Coasts: a preliminary study. *Marine Biology* 151, 2153-2158.
- 41-Pruder, G.D., Brown, C.L., Sweeney, J.N., Carr, W.H., 1995. High health shrimp systems: seed supply— theory and practice, In: *Swimming through troubled water, Proceedings of the special session on shrimp farming, Aquaculture*, pp. 1-4.
- 42-Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496-2497.

- 43-Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4, 406-425.
- 44-Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 5463-5467.
- 45-Sekino, M., Hara, M., Taniguchi, N., 2002. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 213, 101-122.
- 46-Shen, X., Ren, J., Cui, Z., Sha, Z., Wang, B., Xiang, J., Liu, B., 2007. The complete mitochondrial genomes of two common shrimps (*Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis*) and their phylogenomic considerations. *Gene* 403, 98-109.
- 47-Shih, C., Haung, H., Chu, T., Lee, Y., Wang, C., Tzeng, T., 2011. Genetic diversity and historical demography of kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) species complex off China based on mitochondrial DNA analysis. *African Journal of Biotechnology* 10, 1065-1072.
- 48-Simon, C., Franke, A., Martin, A., 1991. The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification, In: *Molecular techniques in taxonomy*. Springer, pp. 329-355.
- 49-Soto-Hernandez, J., Grijalva-Chon, J., 2005. Genetic differentiation in hatchery strains and wild white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone, 1931) from northwest Mexico. *Aquaculture International* 12, 593-601.
- 50-Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28, 2731-2739.
- 51-Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* 22, 4673-4680.
- 52-Valles-Jimenez, R., Gaffney, P., Perez-Enriquez, R., 2006. RFLP analysis of the mtDNA control region in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) populations from the eastern Pacific. *Marine Biology* 148, 867-873.
- 53-Wang, H., Kesinger, J.W., Zhou, Q., Wren, J.D., Martin, G., Turner, S., Tang, Y., Frank, M.B., Centola, M., 2008. Identification and characterization of zebrafish ocular formation genes. *Genome* 51, 222-235.
- 54-Zardoya, R., Castilho, R., Grande, C., FAVRE-KREY, L., Caetano, S., Marcato, S., Krey, G., Patarnello, T., 2004. Differential population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and the chub mackerel (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology* 13, 1785-1798.

### Abstract

In this study, after determining history of origin entering white leg shrimp of broodstocks at hatcheries of country, finally, two population of Molokaei and High health were considered as shrimp broodstocks of specific disease free (SPF) zero generation. After inbreeding and cross breeding among adult males and females of two population above, three storage different were produced in the first generation:  $H^{\sigma} \times M^{\rho}$ ,  $M^{\sigma} \times H^{\rho}$  and  $H^{\rho} \times H^{\sigma}$ . The second generation were produced from selective breeding of  $M^{\sigma} \times H^{\rho}$ . The aim of this study was to determine genetic differences between different generations of specific pathogenic free shrimp by evaluation of 16S rRNA region mitochondrial of different generations. Result of this study showed that of 486 sites have been identified 484 sites were conserved. Also, monomorphic sites ranged between 482 - 486 sites and was consists 2 polymorphic sites and 2 transitional sites. The number haplotypes, haplotypes diversity, nucleotide diversity revealed in this region were 2,  $0.356 \pm 0.159$  and 0.00147, respectively. Due to the high genetic identify and reduce of genetic distance of shrimp between different generations of SPF shrimp, genetic differentiation and gene flow (Nm) between them were -.142 and -2.00, respectively. This rates clearly shows a low level of polymorphism in this region of mitochondrial of different generation of SPF. This may be occurred because of small effective populations and genetic drift. Thus, offspring had inherited mitochondrial genome from your mother, therefore, it is expected that rate of variation in this genome is influenced by several factors, including genetic drift, due to unavailability of new-broodstock from different areas. It was observed that due to high conservation sites in 16S rRNA region of mitochondrial genome, nothing genetic differentiation was observed among different generations of SPF.

**Keyword:** *Litopenaeus vannamei*, mitochondrial genome, 16S rRNA, genetic differentiation

**Ministry of Jihad – e – Agriculture**  
**AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION**  
**Iranian Fisheries Science Research Institute – Shrimp Research Center**

---

**Project Title : Evaluation of genetic different between *Litopenaus vannamei* of different race**

**Approved Number: 134-80-1252-9352-93001**

**Author: Mohammad Khalil Pazir**

**Project Researcher : Mohammad Khalil Pazir, Mohammad Mehdi Simruni**

**Collaborator(s) : B. Ghaednia, Kh. Aeinjamshid, M. Pourkazemi, A. Matinfar, M. Afsharnasab, Gh. Qharibi, E .Safavi, A.A. Zendehebodi, M. Bohrani, Z. Noroozi, H.**

**Rezaei, M. Shomali**

**Advisor(s): Ahmad Ghasemi**

**Supervisor:-**

**Location of execution : Bushehr Province**

**Date of Beginning : 2014**

**Period of execution :2 Years**

***Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute***

***Date of publishing : 2017***

**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 & EXTENSION ORGANIZATION  
Iranian Fisheries Science Research Institute - Shrimp Research Center**

**Project Title :**

**Evaluation of genetic different between *Litopenaus  
vannamei* of different race**

**Project Researcher :**

***Mohammad Khalil Pazir***

**Register NO.**

***51096***