DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.8.2

چندشکلی جایگاه ژنی MHC-DAB II در ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmicthys molitrix*) تکثیرشده به روش نیمه طبیعی

الهام جرفی[۱،۲*]، محمدرضا کلباسی مسجدشاهی[۲*] و مجید صادقی زاده[۳]

[۱] ایران، تهران، آموزش و ترویج کشاورزی، سازمان تحقیقات، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

[۲] ایران، نور، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی، گروه شیلات

[۳] ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۴

چکیده

ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) بخش اعظم تولید ماهیان آب شیرین کشور را بخود اختصاص داده و جایگاه ویژه ای در صنعت آبزی پروری کشور دارد. روش رایج برای تکثیر این گونه در کشورمان، روش نیمه‌طبیعی است که یکی از بارزترین ویژگی‌های آن فراهم شدن فرصت انتخاب جفت برای مولدین است. با توجه به اهمیت مجموعه ژنی MHC در بروز رفتارهای جنسی و نقش تاریخی آن در روند تکامل موجودات زنده بویژه از لحاظ مسایل ایمنی، الگوهای تنوع این جایگاه ژنی بین دو نسل از ماهی فیتوفاگ پرورشی مورد مطالعه قرار گرفت. تعداد ۳۳ مولد نر و ماده فیتوفاگ در قالب دو گروه مستقل به روش نیمه طبیعی تکثیر شد و لاروهای حاصل از هر گروه نمونه برداری گردید. با استفاده از داده‌های ثبت شده در بانک ژن جهانی و طراحی پرایمر مناسب، جایگاه ژنی MHC-DAB در مولدین و لاروهای حاصله با روش SSCP مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز فراوانی شش الگوی ژنوتیپی متفاوت بدست آمده در بین گروه‌ها بیانگر افزایش سطح هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۱) در برابر مقدار قابل انتظار (۰/۶۶۰-۰/۷۰۹) بوده است. انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ در غالب گروه‌های مورد بررسی مشاهده شد و بخش عمده واریانس ژنتیکی به اختلافات درون فردی اختصاص یافت. الگوی توزیع ژنتیکی و تنوع بالای جایگاه MHC-DAB همزمان با حفظ تعداد آلل‌ها در میان لاروها در مقایسه با والدین بیانگر جریان انتخاب مثبت است. آنالیز تلاقی‌های صورت‌گرفته میان مولدین بیانگر وجود گزینشی هدفمند و به احتمال زیاد با دخالت ژن‌های شاخصی همچون MHC-DAB است که هدف نهایی آن برقراری توازن در تنوع ژنتیکی نتاج و افزایش شایستگی‌های آن جهت افزایش بقا و پایداری است. نتایج این تحقیق نشان داد جایگاه ژنی MHC-DAB شاخصی مناسب برای ارزیابی ژنتیکی جمعیت‌ها است.

واژگان کلیدی: فیتوفاگ، تکثیر نیمه‌طبیعی ، مجموعه ژنی MHC، تنوع ژنتیکی

* نویسندگان مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۸۳۸۱۰۷۸ ، پست الکترونیکی: e.jorfi@areeo.ac.ir و kalbassi_m@modares.ac.ir

مقدمه

بخش اعظم تولید آبزیان در سطح جهان به ویژه قاره آسیا به خانواده کپورماهیان پرورشی اختصاص دارد. براساس آخرین آمار ارائه شده از سوی فائو از میان حدود ۴۷/۸ میلیون تن تولید ماهیان آب شیرین در سال ۲۰۱۶ در آسیا، تقریبا ۱۹/۴ میلیون تن به خانواده کپورماهیان پرورشی تعلق داشته و فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) با تولید ۵/۲ میلیون تن پس از کپور علفخوار، بیشترین حجم تولید را دارا بوده است. همزمان در کشور ما ماهی فیتوفاگ با تولیدی معادل۱۱۰ هزار تن از تولید کل کپورماهیان پرورشی به میزان ۲۰۱ هزار تن، بالاترین سهم

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.8.2

تولید و پرورش را به خود اختصاص داده‌است (۶). خاستگاه اصلی کپورماهیان پرورشی مناطق جنوبی و مرکزی چین و رودخانه آمور در روسیه است که به بیش از ۸۰ نقطه مختلف دنیا معرفی گردیدند (۱۲). گله‌های موجود در کارگاه‌های متعدد تکثیر و پرورش کشورمان حاصل چند مرحله واردات و تکثیر مداوم آنها در طول دهه‌های اخیر بوده‌است. اجرای بهینه مدیریت مولدین در کارگاه‌های تکثیر، نیازمند آگاهی از ویژگی‌های زیستی بویژه شاخص‌های تولیدمثلی و تاثیر بالقوه تغییرات ژنتیکی بر بازده تولیدمثلی مولدین است. تنوع ژنتیکی (Genetic diversity) شاخص مهمی از تنوع زیستی است که توانایی سازش (Adaptation) در برابر شرایط متغیر و نامساعد محیطی را برای یک جمعیت فراهم می‌نماید (۱۰). در رابطه با صنعت آبزی‌پروری درک مکانیسم این تغییرات ژنتیکی، پایش آن و تعیین روش مدیریتی متناسب آن از مهم‌ترین عناصر یک مدیریت موفق است (۹). مسلماً فراهم‌نمودن بچه‌ماهی برای تامین نسل بعدی مولدین کارگاه و پایداری این فعالیت، یکی از اهداف اصلی پرورش آبزیان است. از طرفی روش‌های مورداستفاده در تکثیر آبزیان تقریباً همواره با ویژگی‌های رفتار تولیدمثلی گونه موردنظر یا بعبارتی رقابت جنسی و فرصت برای انتخاب جفت تعامل دارند. یکی از مهم‌ترین کارکردهای انتخاب جفت، فراهم‌نمودن امکان گزینش فردی با صفات فنوتیپی مناسب و انتقال صفات مرتبط با شایستگی بقا به فرزندان حاصله است. در انتخاب جفت وابسته به جنسیت نظر بر این است که وجود تلاقی‌های غیرتصادفی و جهت-دار منشأ اصلی پلی‌مورفیسم در ژن‌های MHC است. در واقع یکی از فرضیه‌های مطرح در این‌باره، انتخاب جفت وابسته به MHC به شکل غیرهمسان (Disassortative) است که با تولید فرزندانی با مجموعه متنوع از آلل‌های MHC امکان پاسخ‌های ایمنی بهتر در برابر پارازیت‌ها را در مقایسه با افراد دارای تنوع کمتر ایجاد می‌نمایند (۱۵). مطالعات فراوانی در این ارتباط از جمله در انسان و موش نشان داده‌اند که مولدین بیشتر تمایل به تلاقی با افرادی دارند که واجد ژن‌های MHC متفاوت از آنها هستند. این ترجیح از طریق پیام‌های بویایی صورت می‌گیرد ضمن آن که تحقیقات تاثیر ژن‌های MHC را بر مولکول‌های بویایی مختص هر فرد را اثبات نموده‌است. همبستگی موجود بین تمایلات خاص انتخاب شریک جنسی وابسته به ژن‌های MHC و تولید نتاجی با هتروزیگوسیتی بالاتر، می‌تواند به افزایش مقاومت نسبت به بیماری‌ها منجر شود. همچنین از آنجایی که افراد مشابه از نظر MHC احتمالاً باهم قرابت نزدیکی دارند، شناسایی خویشاوندان و پرهیز از تلاقی با آنها بمنظور کاهش پیشامد همخونی می‌تواند یکی دیگر از عملکردهای این ژن باشد (۱۶). مطالعه Landry و همکاران (۱۳) درباره ارتباط ژن‌های MHC با انتخاب جفت در آزادماهی (*Salmo salar*) با کمک دو نشانگر ریزماهواره و MHC نشان داد که ماهی مولد جفت خود را بر مبنای افزایش هتروزیگوسیتی از نظر MHC در نتاج برمی‌گزینند. با بررسی تعداد آلل‌های مشترک و فاصله ژنوتیپی بین والدین در جایگاه MHC، مشخص شد که آزادماهی اقیانوس اطلس جفت خود را به نحوی انتخاب می‌نماید که هتروزیگوسیتی فرزندان در MHC بویژه در محل اتصال پپتید افزایش یابد که احتمالاً حاصل آن دفاع بهتر در برابر پارازیت‌ها و پاتوژن‌ها است (۱۳). نتایج مشابهی در گونه‌های دیگری همچون ماهیان سه‌خاره (*Gastreosteus aculeatus*) (۲)، قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta* L.) (۷)، ماهی رز بیترلینگ (*Rhodeus ocellatus*) (۳)، صخره‌ماهیان گونه *Sebastes* spp. (۱۱) و آزادماهی چینوک (Evans و همکاران، ۲۰۱۲) مشاهده شده‌است.

مطالعات قبلی درباره ماهی فیتوفاگ نشان از وجود رفتارهای تولیدمثلی بین جنس‌های نر و ماده قبل از تخم-ریزی داشته ضمن آن که تخم‌ریزی به صورت چند مرحله‌ای و در دفعات مکرر انجام شده‌است (۱۲). روش مرسوم در کارگاه‌ها برای تکثیر ماهی فیتوفاگ، روش نیمه-طبیعی یا تکثیر در حوضچه‌های گرد است که فرصت

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.8.2

انتخاب جفت را برای مولدین ایجاد می‌کند و این موضوع از جهت ژن‌هایی همچون مجموعه ژنی MHC که در تشخیص میزان خویشاوندی نقش مهمی دارند، قابل تامل است. لذا هدف در مقاله فعلی مطالعه مولدین فیتوفاگ و نسل اول حاصل از آنها، ارزیابی وضعیت تنوع مجموعه ژنی MHC و نحوه توزیع فراوانی آن در میان مولدین و فرزندان است.

مواد و روشها

تکثیر مولدین فیتوفاگ در طول فصل تکثیر (اواخر اردیبهشت تا اوایل تیرماه) به روش نیمه‌طبیعی (استخر گرد) در کارگاه آبزی‌گستران‌امروز، واقع در شهرستان شوشتر، استان خوزستان (۳۲/۰۱ عرض شمالی و ۴۸/۸۶ طول غربی) انجام شد و و از لاروهای حاصله و مولدین شرکت‌کننده در هر یک از تیمارها نمونه‌برداری انجام‌شد. برای این منظور مجموعاً تعداد ۱۶ مولد ماده و ۱۸ مولد نر ماهی فیتوفاگ طی دو عملیات مستقل (در دو هفته متوالی) تکثیر شدند. در عملیات تکثیر نیمه‌طبیعی۱ (Semi-natural1 (Semi1))، ۸ مولد ماده با میانگین وزنی (۵۳۲۰±۴۳۸/۱۶g) و ۷ مولد نر با میانگین وزنی (۴۱۵۰±۱۹۲/۷۲g) و در عملیات تکثیر نیمه‌طبیعی۲ ((Semi-natural2 (Semi2) تعداد ۸ مولد ماده (۵۳۱۳/۷۵±۲۵۰/۸۱ g) و ۱۰ مولد نر (۶۲۲۰±۴۹۶/۳g) مورداستفاده قرارگرفتند. پس از تزریق هورمون جهت القای مولدین و تامین شرایط مناسب در استخرهای گرد و بروز رفتارهای جفت‌یابی در مولدین، تخم‌ریزی آغاز گردید. پس از جمع آوری تخم‌ها و انتقال آنها به انکوباتور مراحل بعدی تکاملی تا حصول لارو طی گردید. ضمن برداشت باله دمی از مولدین هر دو گروه از عملیات تکثیر نیمه طبیعی، لاروهای مربوط به هرکدام نیز نمونه برداری شدند. بمنظور بررسی جایگاه ژنی MHC-DAB از توالی مشابه در ماهی کپور معمولی (با شماره دسترسی Z47757 در بانک ژن) الگوبرداری گردید (۱۹) و آغازگرهای مناسب از طریق سفارش به شرکت (Macrogene, Korea) تهیه شد.

جدول۱- مشخصات جایگاه مورداستفاده در آنالیز مجموعه ژنی MHC

نام آغازگر	توالی آغازگر	Tm(°C)	منبع
ex2F	5′-tctgacataactgtaatgctgc-3′	۵۹	Yu و همکاران، ۲۰۱۳
ex2R	5′-caggagagatcagagtcttg-3′	۵۹	(شماره دسترسی Z47757:NCBI)

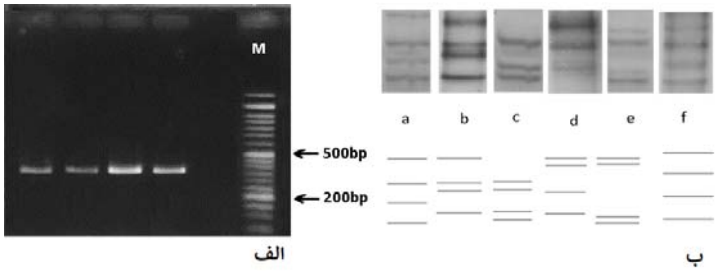
پس از بهینه‌سازی شرایط PCR، واکنش پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BIO-RAD(T100) و در حجم ۲۰ میکرولیتر از محلول پایه Ampliqon انجام شد که شامل $MgCl_2$ با غلظت ۱/۵ mM، بافر 1X، ۲ واحد آنزیم Taq، ۴۰۰ میکرومولار dNTP، ۰/۲میکرومولار از هر جفت آغازگر رفت و برگشت (Macrogen, Korea) ، 100ng DNA و آب مقطر استریل (تزریقی) تا رسیدن به حجم نهایی بود. برای تکثیر اختصاصی این جایگاه ژنی شرایط واکنش بدین شرح تعیین شد: واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴°C به‌مدت ۳ دقیقه پس از آن واسرشته سازی در ۹۴°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر با دمای ۵۹°C به‌مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲°C به‌مدت ۵۰ ثانیه با تعداد ۳۵ چرخه و نهایتا برای اتمام تکثیر، بسط پایانی با دمای ۷۲°C بمدت ۱۰ دقیقه انجام شد. بمنظور اجرای فرایند واسرشته‌سازی محصول PCR (SSCP)، مقدار ۵ میکرولیتر از فرآورده با ۱۵ میکرولیتر محلول واسرشته‌ساز SSCP (بافر بارگذاری فرمامید، NaOH (۰/۱مولار)، TBE (نیم مولار))در یک میکروتیوب بمدت ده دقیقه در دمای ۹۵°C قرار داده‌شد. سپس ضمن قرارگیری در معرض شوک سرما با استفاده از باکس حاوی یخ و حصول ساختار سه بعدی برای DNAهای تک‌رشته‌ای (۱۵ دقیقه) برای راندن در ژل پلی‌اکریلامید همراه با یک دستگاه مبرد (DESAGA) بارگذاری شدند و الکتروفورز با جریان الکتریسیته بمیزان ۱۰ ولت بازای هر سانتی‌متر از ژل و

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.8.2

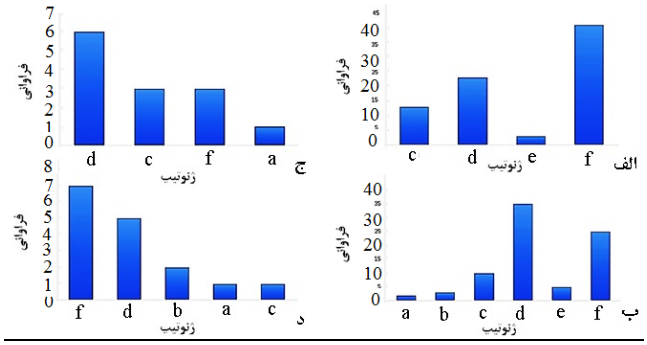
بمدت ۱۸ ساعت برقرار گردید. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره طبق روش (۴) انجام شد. پس از ارزیابی الگوی نواربندی در میان نمونه‌های SSCP شده و مقایسه آنها با نتایج بدست‌آمده در مطالعات پیشین (۱۹)، انواع آلل‌های به‌دست‌آمده شناسایی‌گردید. بمنظور تایید الگوی بدست‌آمده با روش تعیین‌توالی، قطعه ژنی کلون شده در الگوهای متنوع ژنوتیپی جهت تعیین توالی به شرکت Macrogene (کره جنوبی) ارسال گردید. از نرم-افزار Gel Scanner (Ver. 1.3) برای ارزیابی باندهای حاصل در ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید بهره برده شد. برای انجام آنالیزهای مربوط به ترکیب و تنوع نوکلئوتیدی از گزینه Blast در سایت بانک ژن جهانی (NCBI) و نرم‌افزار DnaSp 5.10 (۱۴) استفاده‌شد. داده‌های بدست‌آمده از ژنوتیپ‌های جمعیت‌ها به برنامه صفحه گسترده Excel 2007 انتقال یافته، مرتب‌سازی شدند. شاخص‌های تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌ها شامل فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و موردانتظار، وضعیت جمعیت با توجه به شاخص هاردی-وینبرگ و تمایز بین جمعیت‌ها با کمک برنامه‌های POPGENE (1.32)، GenAlEx (6.41) بررسی شدند. غنای آللی و تنوع ژنتیکی، شاخص‌هایی همچون F_{ST}، فاصله Nei و آنالیز AMOVA با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx و FSTAT محاسبه شد.

نتایج

محصول واکنش PCR مربوط به جایگاه DAB ژنوم MHC کلاس II ماهی فیتوفاگ با وزن حدود ۳۵۰ bp بدون هیچ-گونه باند جانبی در نمونه‌های مورد مطالعه بدست‌آمد. نتایج SSCP محصول PCR مربوط به DNA بدست‌آمده از مولدین و لاروهای هر گروه تکثیر یعنی Semi1 و Semi2 نشان داد که جایگاه MHC-DAB II در کل نمونه‌ها، ۶ ژنوتیپ متمایز ایجاد نموده است (شکل۱) که فراوانی هر یک در دو گروه مورد مطالعه و مولدین هر گروه در شکل ۲ مشاهده می‌شود.



شکل۱- الف- محصول PCR جایگاه MHC-DAB کلاس II در ماهی فیتوفاگ، در آگارز یک درصد (M: نشانگر وزنی استاندارد). ب- آنالیز SSCP ژن MHC-DAB در ماهی فیتوفاگ و شش ژنوتیپ مختلف حاصله.



شکل۲- نمودار فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه MHC در مولدین و دو گروه از لاروهای حاصل از تکثیر نیمه‌طبیعی ماهی فیتوفاگ (الف و ب: فراوانی ژنوتیپی بین لاروهای گروه تکثیر نیمه‌طبیعی ۱ و ۲؛ ج و د: فراوانی ژنوتیپی بین مولدین گروه تکثیر نیمه‌طبیعی ۱و ۲).

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.8.2

پس از هم‌ردیف‌نمودن توالی‌های بدست‌آمده در آلل‌های شناسایی شده جایگاه MHC-DAB و مقایسه آنها با توالی گونه مرجع (کپور معمولی)، صحت توالی‌های مذکور مورد تایید قرار گرفت. بنا بر نتایج آنالیز با نرم‌افزار DnaSp، میانگین اختلاف در جایگاه‌های همسان (dS) و غیر همسان (dN) بین آلل‌ها، بترتیب معادل ۰/۲۵ و ۰/۳۰ و نسبت این دو عامل برابر با ۱/۲ بدست آمد.

داده‌های مربوط به آنالیز تنوع ژنتیکی در جایگاه MHC، از جمله میزان هتروزیگوسیتی، تعداد مؤثر آللی، شاخص تثبیت برای هریک از جمعیت‌های مورد مطالعه درباره والدین مشارکت‌کننده در دو گروه تکثیر نیمه‌طبیعی و لاروهای هر یک، در جدول۱ مشاهده می‌شود. در همه گروه‌ها تعداد آلل‌ها بین گروه‌های والدینی و لاروها ثابت و برابر با ۴ بود و از این نظر اختلافی بین مولدین و لاروهای حاصله در هر گروه مشاهده نشد.

جدول۲- آنالیز تنوع ژنتیکی در ژنوم MHC در مولدین و لاروهای حاصل از گروه‌های تکثیرشده به‌روش نیمه‌طبیعی در ماهی فیتوفاگ

شیوه تکثیر	جمعیت	N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
تکثیر نیمه‌طبیعی Semi1	L1	۸۰	۴	۲/۹۳۹	۱/۲۰۶	۱	۰/۶۶۰	۰/۶۶۴	-۰/۵۱۶
	P1	۱۳	۴	۳/۱۸۹	۱/۲۷۱	۱	۰/۶۸۶	۰/۷۱۴	-۰/۴۵۷
	میانگین		۴	۳/۰۶۴	۱/۲۳۹	۱	۰/۶۷۳	۰/۶۸۹	-۰/۴۸۶
	SE (انحراف معیار)		۰	۰/۱۲۵	۰/۰۳۲	۰	۰/۰۱۳	۰/۰۲۵	۰/۰۲۹
تکثیر نیمه‌طبیعی Semi2	L2	۸۰	۴	۳/۲۰۱	۱/۲۵۹	۱	۰/۶۸۸	۰/۶۹۲	-۰/۴۵۴
	P2	۱۶	۴	۳/۴۳۶	۱/۳۰۵	۱	۰/۷۰۹	۰/۷۳۲	-۰/۴۱۰
	میانگین		۴	۳/۳۱۹	۱/۲۸۲	۱	۰/۶۹۸	۰/۷۱۲	-۰/۴۳۲
	SE (انحراف معیار)		۰	۰/۱۱۸	۰/۰۲۳	۰	۰/۰۱۱	۰/۰۲۰	۰/۰۲۲

(N: تعداد افراد بررسی‌شده در هر گروه، Na: تعداد آلل مؤثر، Ne: اندازه مؤثر آلل‌ها، Ho: هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده، He: هتروزیگوسیتی موردانتظار،uHe: هتروزیگوسیتی موردانتظار نااریب (اصلاح شده)، F: شاخص تثبیت، P1 و P2: مولدین مورداستفاده در تکثیر نیمه‌طبیعی ۱و ۲، L1 و L2: لاروهای حاصله در تکثیر نیمه‌طبیعی ۱ و ۲)

جدول۳- آزمون مربع‌کای جمعیت‌های موردبررسی در میان والدین (P) و لاروهای (L) دو گروه ۱ و ۲ تکثیرشده به روش نیمه‌طبیعی در ماهی فیتوفاگ

جمعیت	درجه آزادی	مربع کای	احتمال	معنی‌داری
L1	۶	۶۹/۹۳۶	۰/۰۰۰	***
P1	۶	۱۱/۳۷۵	۰/۰۷۷	ns
L2	۶	۵۱/۴۷۰	۰/۰۰۰	***
P2	۶	۱۴/۰۵۵	۰/۰۲۹	ns

سطوح معنی‌داری در سه سطح مختلف و عدم معنی‌داری نیز با ns مشخص شده‌اند
(ns =not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001)

تعداد مؤثر آلل (Ne) در این جایگاه ژنی دامنه‌ای بین ۲/۹۳ در میان لاروهای Semi1 تا ۳/۴۳ در مولدین گروه Semi2 را نشان می‌دهد که نسبت به تعداد آلل مشاهده‌شده، در گروه دوم سطح بالاتری از Ne را شاهد هستیم. هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده در بین همه گروه‌ها یکسان است. از مقایسه هتروزیگوسیتی موردانتظار بین دو گروه دامنه‌ای بین ۰/۶۶۰ در لاروهای گروه اول تا ۰/۷۰۹ در مولدین Semi2 حاصل شده و از نظر هتروزیگوسیتی نااریب (UHe) نیز وضعیتی متقارن با He بدست‌آمده است شاخص تثبیت (F) از ۰/۴۱۰- در مولدین گروه Semi2 تا ۰/۵۱۶- در میان لاروهای گروه دوم متغیر بوده که در همه گروه‌ها مقادیری منفی از این پارامتر قابل مشاهده‌است

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.8.2

(جدول۲). آزمون کای-اسکور بمنظور بررسی احتمال انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ بیانگر وجود انحراف از تعادل مذکور در میان فرزندان هر دو گروه تکثیر نیمه طبیعی ۱ و ۲ بوده است (جدول۳). شاخص Fst که بیانگر تغییرات هتروزیگوسیتی در سطح زیرجمعیت نسبت به کل جمعیت است، برابر با ۰/۰۰۵ و فاقد معنی‌داری ارزیابی شد. آزمون واریانس مولکولی (AMOVA) بر روی داده-های حاصل از جایگاه MHC-DAB نشان‌داد سهم عمده (تقریباً کل مقدار واریانس) به تفاوت‌های درون‌فردی مرتبط است و مقادیر تمایز درون‌جمعیتی و بین‌جمعیتی برای این جایگاه بسیار ناچیز است.

بحث و نتیجه‌گیری

آنالیزهای جمعیتی با استفاده از داده‌های حاصل از تنوع جایگاه MHC-DAB در نمونه‌های مختلف والدین و لاروها در گروه‌های تکثیر نیمه‌طبیعی، نشان داد که اولا تعداد آلل‌های منتقل شده از والدین به فرزندان برابر بوده، اندازه مؤثر آللی در گروه Semi2 نسبت به Semi1 فاصله کمتری بین والدین و فرزندان نشان می‌دهد. در رابطه با هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده همه گروه‌ها بطور نسبی سطح بالایی از این شاخص را نشان دادند و اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (P>۰/۰۵). از نظر انطباق با تعادل هاردی – وینبرگ نیز با وجود مشاهده وضعیت متعادل در گروه‌های والدینی، خروج از تعادل در لاروهای هر دو گروه کاملاً مشهود است که با توجه به افزایش سطح هتروزیگوسیتی در این جایگاه ژنی در فرزندان، چنین نتیجه ای دور از انتظار نیست (۱۸). از نظر شاخص‌های مرتبط با تمایز جمعیتی مشخص گردید با وجود مقادیر بسیار جزئی Fst برای مقایسه‌های بین‌جمعیتی، بخش عمده واریانس اختلاف در MHC-DAB به تفاوت‌های درون‌فردی تعلق دارد. همچنین در مطالعه مشابهی که Rakus و همکاران (۱۷) با استفاده از جایگاه MHC-DAB بر روی لاین‌های مختلف ماهی کپور انجام دادند، نتیجه مشابهی بدست آمد بطوری که ۸۰/۲ درصد از تنوع این جایگاه به سطوح درون فردی اختصاص یافت. در مجموع با توجه به نتایج حاصله در رابطه با تکثیر نیمه‌طبیعی فیتوفاگ و الگوی توزیع آللی در جایگاه MHC-DAB از والدین به فرزندان در مقایسه با تنوع بالای مورد انتظار در MHC II بطور کلی (در مقایسه با سایر گونه‌ها و نه تنها کپور معمولی)، با وجود تعداد محدود آلل‌ها در این جایگاه شواهدی از وجود انتخاب مثبت در میان همین تعداد آلل بدست آمد ضمن آن که تنوع آللی بین دو نسل حفظ شد. Hedrick و همکاران (۸) چنین بیان نموده‌اند که در برخی گونه‌ها، جمعیتی که تنوع نسبتاً کمی از MHC را نشان می‌دهد، همان آلل‌های موجود بقدری حالت انشعاب و واگرایی را از خود نشان می‌دهند تا بتوانند هدف غایی این ژن را که همانا شناسایی دامنه وسیع‌تری از انواع پاتوژن‌هاست، بدست‌آورند. با توجه به این که اساساً ماهی فیتوفاگ بومی کشور ما نیست و در ارتباط با تنوع واقعی این جایگاه در این گونه نیز اطلاعاتی وجود ندارد لذا قضاوت درباره تنوع این جایگاه به شکل اصلی و مبدئی میسر نبوده و تنها به آنچه موجود است، محدود می‌شود. طبق گزارش‌های شفاهی و رسمی محققین کشورمان (۱) و مشاهدات نگارنده، در دهه اخیر، تلفاتی در میان فیتوفاگ بخصوص در کارگاه‌های پرورشی خوزستان رخ داده‌است. با شناختی که پیش از این از حساسیت جایگاه MHCII در مطالعات متعدد بدست‌آمده بروز واکنش نسبت به عامل ایجادکننده تلفات را می توان انتظار داشت که حاصل آن افزایش تنوع آللی در این جایگاه بوده است. بر این اساس ارائه پاسخ-های مبتنی بر انتخاب مثبت در این جایگاه با توجه به محدودیت‌های پیش آمده در جمعیت (وجود تلفات) یک فرایند منطبق بر اصل تکامل موجودات جهت بقای بیشتر بازماندگان بوده و کاملاً بدیهی است. ضمن آن که طی این تلفات احتمال از میان رفتن بخشی از تنوع آللی در اثر بروز تنگنای ژنتیکی نیز وجود دارد و نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. با توجه به شواهد فراوان دال بر دخالت این جایگاه

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.8.2

ژنی در مباحث تکاملی و رفتاری مثل نقش آن در افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها که بواسطه رفتارهای جنسی بین مولدین نر و ماده و به شکل مدیریت هدف‌دار تلاقی‌ها جهت افزایش شایستگی‌های نتاج برای مقابله با طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا صورت می‌گیرد، اجرای مطالعات پایشی درباره وضعیت پراکنش تنوع جایگاه ژنی MHC در کارگاه‌های مادر کشور می‌تواند اطلاعات مفیدی را در راستای استفاده مؤثرتر از این سرمایه حیاتی بدست-دهد. ضمن آن که در مطالعه کنونی و در بخش تکثیر نیمه-طبیعی مشاهده شد با وجود اختلافات معنی‌دار در مشارکت مولدین در روند تکثیر، حاصل نهایی تلاقی‌های انجام شده به شکلی بوده که تنوع ژنتیکی در میان والدین و نتاج تفاوت معنی‌داری نشان نداده است. علاوه بر این بررسی توالی‌های این جایگاه ژنی بیانگر وجود جریان انتخاب مثبت (dN/dS>1) در آن‌ها است. بعبارتی دیگر به نظر می‌رسد نوعی از تلاقی‌های هدفمند در میان مولدین در جریان است تا این توازن را برقرار سازد و این موضوع نه تنها در این مطالعه بلکه در تحقیقات سایرین نیز مشاهده شده و بیانگر نقش و اهمیت این جایگاه در استراتژی‌های تکاملی اتخاذشده در موجودات از جمله ماهی فیتوفاگ است. در مجموع با توجه به ماهیت سازشی جایگاه ژنی MHC-DAB class II که بیشترین میزان تنوع را در بین جایگاه‌های مختلف این ژن دارا است و قرارداشتن در منطقه کدکننده که مستقیماً بازگوکننده توانایی و انعطاف-پذیری جمعیت در برابر پدیده‌هایی اثرگذار همچون همخونی و مقاومت در مقابل بیماری‌هاست، مطالعات صورت‌گرفته در ماهی فیتوفاگ بر روی این جایگاه نیز نمایان‌گر قدرت این جایگاه ژنی در ارائه اطلاعات درباره وضعیت ژنتیکی گروه‌های مطالعاتی بوده‌است.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به کلیه افرادی که در تامین نمونه‌های این تحقیق ما را یاری‌کردند، بویژه مسؤولین و پرسنل محترم کارگاه آبزی‌گستران‌امروز، واقع در استان خوزستان (شهرستان شوشتر) ابراز می‌دارد.

منابع

۱- سیدمرتضایی، س.ر.، هوشمند، ح.، آهنگرزاده، م.، جُرفی، ا.، دهقان‌مدیسه، س.، کیان‌ارثی، ف.، توسلی، م.، سلیمانی، ج.، محسنی‌نژاد، ل. و سنجری، م.، ۱۳۹۱. طرح مطالعاتی پایش مزارع گرم‌آبی بمنظور تشخیص علل تلفات ماهی کپورنقره‌ای، اداره کل شیلات استان‌خوزستان، ۱۶۲ص.

2- Aeschlimann P.B., Haberli M.A., Reusch T.B.H., Boehm T. and Milinski M., 2003. Female sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* use self-reference to optimize MHC allele number during mate selection. Behavioral Ecology and Sociobiology, 54:119–126.

3-Agbali M., Reichard M., Bryjova A., Bryja J. and Smith C., 2009. Mate selection for nonadditive genetic benefits correlate with MHC dissimilarity in the Rose Bitterling (*Rhodeus Ocellatus*). Evolution, 64(6):1683–1696.

4- Benbouza H., Jacquemin J.M., Baudoin J.P. and Meergeai G., 2006. Optimization of the reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 10:77-81.

5- Evans M., Neff B.D. and Heath D.D., 2012. Behavioural and genetic analyses of mate choice and reproductive success in two Chinook salmon populations. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 70:263–270.

6- FAO, 2016. Fisheries and aquaculture software. FishStatJ – software for fishery statistical time series. In FAO Fisheries and Aquaculture Department [Online], Rome. Updated June 2016. http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en.

7- Forsberg L.A., Dannewitz J., Petersson E. and Grahn M., 2007. Influence of genetic dissimilarity in the reproductive success and mate choice of brown trout –females fishing for optimal MHC dissimilarity, Journal of Evolutionary Biology, 20:1859-1869.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.8.2

8- Hedrick P.W., 1999. Balancing selection and MHC. Genetica, 104:207–214.

9- Hedrick P.W., 2004. Recent developments in conservation genetics. Journal of Forest Ecology and Management, 197:3-19.

10-Horreo J.L., Machado-Schiaff-ino G., Griffiths A., Bright D., Stevens J. and Garcia-Vazquez E., 2008. Identification of differential broodstock contribution affecting genetic variability in hatchery stocks of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Journal of Aquaculture, 280:89-93.

11- Johansson M.L., Clifford K., Fodness B., Vazquez N.A. and Banks M.A., 2012. Mate selection in captive-breeding rockfishes Sebastes spp.: inference from parentage analysis and the major histocompatibility complex (MHC). Marine ecology progress series, 460:195-206.

12- Kolar C.S., Chapman D.C., Courenay W.R., Housel C.M., Williams J.D. and Jennings D.P., 2005. Asian carps of the Genus *Hypophtalmichthys* (Pisces Cyprinidae) – A biological synopsis and environmental Risk assessment, Report to U.S. Fish and Wildlife Service per Interagency Agreement. 94400-3-0128. p. 173.

13- Landry C. and Bernatchez L., 2001. Comparative analysis of population structure across environments and geographical scales at major histocompatibility complex and microsatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Molecular Ecology, 10:2525-2539.

14- Librado P. and Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25:1451-1452.

15- Penn D. and Potts, W., 1998. MHC-disassortative mating preferences reversed by cross-fostering. Journal of the Royal society, 265:1299-1306.

16- Penn D.J., 2002. The Scent of Genetic Compatibility: Sexual Selection and the Major Histocompatibility Complex. Ethology, 108:1-21.

17- Rakus K.L., Wiegertjes G.F. and Adamek M., 2008. Application of PCR-RF-SSCP to study major histocompatibility class II B polymorphism in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Fish Shellfish Immunology, 24:734–744.

18- Tregenza T. and Wedell N., 2000. Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: Invited Review. Molecular ecology, 9:1013-1027.

19- Yu H., Tan S., Zhao H. and Li H., 2013. MH-DAB gene polymorphism and disease resistance to *Flavobacterium columnare* in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Gene, 526:217–222.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.8.2

MHC-DAB II gene polymorphism in silver carp (*Hypophthalmicthys molitrix*) propagated by semi-natural method

Jorfi E.[1,2], Kalbassi MasjedShahi M.R.[2] and Sadeghizadeh M.[3]

[1] **Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. of Iran.**

[2] **Dept. of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, I.R. of Iran.**

[3] **Dept. of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, I.R. of Iran.**

Abstract

Silver carp *(Hypophthalmichthys molitrix*) as the major species in total production of freshwater fish, has a special place in the aquaculture industry of Iran. The common method for breeding of this species in the country is semi-natural method which provides the brooders opportunities for mate selection that is one of the most striking features in this method. Given the importance of MHC gene complex to sexual behaviors and its historical role in the process of evolution of living organisms especially in terms of safety issues, various patterns of mentioned loci between two generations of Silver carp were studied. 33 males and female silver carp were reproduced in two independent groups by semi-natural method after that larvae in each group were sampled. Using data in NCBI and designing the appropriate primer, MHC-DAB loci of the parents and their F1 were studied by SSCP method. Analysis of six different genotypes between the samples indicated an increased level of observed heterozygosity (1) compare to the expected value (0.660 -0.709). Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was observed in most groups and the main share of genetic diversity assigned to individual differences. The pattern of genetic diversity distributed in larvae and high variation of MHC-DAB loci meanwhile retaining number of the alleles, represents a positive selection. Analysis of crosses between parents indicates a targeted selection based on genes such as MHC-DAB, whose ultimate goal is to balance the genetic diversity of the progeny and increase its merits to increase survival and stability. The results of this study indicated that the MHC-DAB gene loci is an appropriate indicator for genetic evaluation of populations.

Key words: Silver carp, Semi-natural propagation, MHC gene complex, Genetic diversity