Archive of SID

استفاده ازنشانگرهای ریزماهواره پیوسته با صفت مقاومت به ویروس IHN در غربالگری جمعیت مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مژده محمدطاهری[1]، علیرضا میرواقفی*[2]، حمید فرحمند[2]، باقر مجازی‌امیری[3]، ندا قوتی[1] ،بیتا خلیلی[4]

[1] دانش آموخته کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

[2] استادیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

[3] استاد دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

[4] کارشناس‌ارشد زیست شناسی سلولی و ملکولی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ٨٨/٢/٢٠، تاریخ تصویب: ٨٨/١٢/٩)

چکیده

به منظور بررسی ساختار و غربالگری جمعیت مولدین ماهی قزل آلای رنگین کمان کارگاه شهید باهنر کلاردشت براساس حضور یا عدم حضور نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با صفت مقاومت به ویروس IHN در این مولدین، تعداد۹۲ نمونه از بافت باله دمی مولدین در فصل تکثیر تهیه و پس از استخراج DNA از نمونه‌ها، به تکثیر این جایگاه‌های ریزماهواره پرداخته شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای تکثیر ریزماهواره‌های پیوسته با صفت مقاومت به ویروس IHN در مولدین، به منظور بررسی حضور یا عدم حضور این نشانگرها بر اساس دو پرایمر Ssa94NVH وSsa7NVH انجام گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش حضور نشانگرهای Ssa94NVH و Ssa7NVH را در این جمعیت به ترتیب ٩٥/٤٦و ٩٨/٤٩ درصد گزارش نمودند. تعداد چند شکلی‌های تولید شده برای این دو نشانگر نیز به ترتیب شامل ١١ و ٤ چند شکلی بود. در بررسی حضور دو نشانگر مذکور به تفکیک جنسیت در دو جنس نر و ماده بر اساس نشانگرSsa94NVH به ترتیب ٩٢/٤و ٩٧/٥ درصد و بر اساس نشانگر Ssa7NVH به ترتیب ١٠٠ و ٩٧/٥ درصد حضور این نشانگرها نشان داده شد.

واژه‌های کلیدی: قزل آلای رنگین کمان، نشانگرهای ریزماهواره، مقاومت به بیماری IHN، غربالگری ژنتیکی، انتخاب مبتنی بر نشانگرها

* نویسنده مسئول: تلفن: ٠٢٦١-٢٢٤٥٩٠٨ فاکس: ٠٢٦١-٢٢٤٥٩٠٨ E-mail: vaghefi@nrf.ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بر اساس گزارش فائو (FAO, 2007) ؛ تولید آبزیان پرورشی مقداری بالغ بر ۵۲ میلیون تن گزارش گردیده است، اما متاسفانه بیماری‌های عفونی همه ساله درصد بالایی از تلفات (۱۰ درصد) را در محصولات آبزی پروری به خود اختصاص می‌دهند که منجر به اثرات جبران ناپذیر اقتصادی می‌گردد. ماهی قزل آلای رنگین کمان یکی از ماهیان مهم اقتصادی از خانواده آزاد ماهیان محسوب می‌گردد که در ایران نسبت به سایر ماهیان از تولید بالاتری برخوردار می‌باشد. سهم تولید این گونه در برنامه چهارم توسعه شیلات ایران (۱۳۸۸) بالغ بر ۶۰۰۰۰ تن برآورد شده است (Abdolhay, 2005).

بیماری نکروز عفونی خونی (IHN)[1] یک عفونت رابدوویروسی در آزاد ماهیان است که برای اولین بار در سال ۱۹۶۷ در قزل آلای رنگین کمان شناسایی گردید. این بیماری دارای انتقال عمودی ،همه گیری و تلفات بالایی در آزاد ماهیان می‌باشد که می تواند اثرات نامطلوب اقتصادی را سبب شود (Ozaki *et al.*, 2000). بنابراین، توجه به سلامت این ماهی از موارد اساسی به شمار می رود که باید مولدین و جمعیت های آن از نظر انواع بیماری‌ها به خصوص بیماری‌های عفونی و واگیردار از جمله بیماری IHN مورد سنجش قرار بگیرند تا بتوان به جمعیتی مقاوم به بیماری‌ها برای جوابگویی به نیاز جامعه دست یافت.

روش‌های تشخیص ملکولی نسبت به روش‌های بافت شناسی و خون شناسی که به صورت متداول برای شناسایی عوامل بیماری زا به کار می‌روند حساس‌تر و سریع‌تر هستند. در طی چند سال گذشته استفاده از روش‌های ملکولی، برای تعیین بیماری‌های آبزیان افزایش یافته است. شناسایی سریع و به موقع بیماری‌ها توسط این روش‌ها می‌تواند سبب کاهش شیوع آن‌ها و ایجاد جمعیت‌های مقاوم گردد. بنابراین، به دنبال استفاده از این روشها درمان آنتی بیوتیکی کاهش یافته و تولید سویه‌های باکتری مقاوم به آنتی بیوتیک ها به حداقل خواهد رسید. این روش‌ها برای تشخیص ملکولی در میکروارگانیسم‌های قابل کشت، غیرقابل کشت و یا حتی مرده یک روش بسیار مفید به شمار می‌روند.

اصلاح ژنتیک گونه‌های آبزی فرصت مهمی را برای بهبود محصول تولیدی، سلامت، کیفیت تولید و نهایتا سودآوری در کارهای آبزی پروری ارائه می نماید. روش‌های موجود که می توانند برای بهبود چند جانبه مطالعات به کار گرفته شوند، دارای ارزش اقتصادی نیز بوده و می توانند پاسخگوی برنامه‌های اصلاح نژادی باشند. روش‌های ژنتیکی جدید، شامل استفاده از روش‌هایی که بر اساس DNA هستند، برای گونه‌های آبزی پروری در حال توسعه می‌باشند. تهیه نقشه‌های ژنتیکی بر اساس نشانگرها ، شناسایی جایگاه‌های ژنی صفات کمی (QTL_S) و نشانگر های پیوسته با آن‌ها را مقدور کرده است. شناسایی جایگاه‌های ژنی صفات کمی و نشانگر های مرتبط و یا پیوسته با آن‌ها توسط روش انتخاب بر مبنای نشانگر (MAS) در گونه‌های آبزی‌پروری، بهبود صفات مهم اقتصادی به ویژه صفاتی که سخت اندازه‌گیری می‌شوند مانند ضریب تبدیل غذایی و مقاومت به بیماری‌ها را تسهیل نموده است (Chistiakov *et al*. ,2006).

برای انجام MAS درجمعیت ها در ابتدا نیاز به حضور خانواده‌های شناسنامه دار و نقشه‌های پیوستگی مختص به آن‌هاست (Clark, 2003)، اما از آنجائیکه جمعیت مورد نظر در این تحقیق، یک جمعیت وارداتی متشکل از جمعیت های متفاوت بوده و خانواده‌ها در آن به صورت مجزا مشخص نمی‌باشند؛ با توجه به نقشه‌های پیوستگی موجود برای گونه موردنظر (قزل آلای رنگین کمان)، Oligo screening برای صفت وابسته به QTL بیماری IHN انجام گرفت تا نتایج به دست آمده بتواند در برنامه‌های اصلاح نژاد بعدی در این جمعیت مدنظر قرار گیرند.

بنابراین، با توجه به نقش اساسی و مهم بیماری‌ها و تشخیص آنها در اقتصاد آبزی پروری و این که مقاوم بودن یا نبودن نسبت به بیماری‌ها و یاحساس بودن به ابتلا به یک بیماری در موجودات قابل پیش بینی نمی‌باشد، می توان نتیجه گرفت که استفاده از روش‌های ملکولی، بالاخص روش MAS می تواند کمک شایانی به بهبود سلامت

۱- Infectious hematopoietic necrosis

www.SID.ir

Archive of SID

جمعیت ماهیان پرورشی و جلوگیری از بروز و شیوع بیماری‌های مخرب نماید (Dekkers, 2004).

مهمترین هدف اجرایی این تحقیق عبارت است از بررسی حضور یا عدم حضور لوکوس های مقاوم به بیماری IHN در جمعیت مولدین قزل آلای رنگین کمان کارگاه شهید باهنر کلاردشت (به عنوان یکی از کارگاه‌های اصلی تامین کننده مولدین قزل آلای رنگین کمان در کشور) که بر مبنای پیوستگی آن با ریزماهواره‌های گزارش شده در مقالات و مطالعات پیشین (Ssa7NVH، Ssa94 NVH) انجام گردیده است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و انتقال نمونه‌ها

به منظور غربالگری و انتخاب مولدین واجد نشانگرهای پیوسته با QTL کنترل کننده مقاومت به ویروس IHN، تعداد ۹۲ نمونه از بافت باله دمی مولدین مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت در فصل تکثیر (۱۳۸۶/۱۱/۱۷) تهیه و پس از تثبیت در اتانول ۹۶ درصد و یکبار تعویض الکل، به آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه شیلات و محیط‌زیست دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل گردید. لازم به ذکر است که قبل از تهیه بافت باله دمی، مولدین مورد زیست‌سنجی قرار گرفتند. صفات مورد بررسی در زیست سنجی این مولدین شامل طول کل، طول استاندارد، طول سر، عرض و وزن بدن بودند.

استخراج DNA و تعیین کیفیت و کمیت آن

پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، استخراج DNA از آنها به دو روش کیلاکس و فنل- کلروفرم (Sambrook & Russell, 2001, Estoup *et al*., 1996) صورت پذیرفت. سنجش کیفیت DNA استخراج شده از بافت، به کمک الکتروفورز در ژل آگارز ۸/ ۰درصد انجام گرفت. همچنین سنجش کمیت DNA استخراج شده از بافت به کمک الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد با غلظت‌های متفاوت DNA فاژ λ و روش اسپکتروفتومتری صورت پذیرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمر از (PCR)

محصولات DNA بدست آمده به منظور بررسی حضور و یا عدم حضور جایگاه‌های ژنی مرتبط با صفت مقاومت به بیماری IHN برای غربالگری جمعیت مولدین توسط پرایمرهای Ssa7NVH و Ssa94NVH واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شدند. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش بر اساس مکاتبات شخصی با دکتر رکسرود (مرکز USDA امریکا) و مطالعه رودریگز و همکاران در سال ۲۰۰۴، بر اساس نقشه پیوستگی قزل آلای رنگین کمان (Sakamoto *et al*., 2000) انتخاب شدند. مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با غلظت های آب ۱۵/۲۵-۱۳میکرولیتر، بافر 10x PCR ، Mgcl2 ۵۰ میلی مولار، dNTP ۱۰ میلی مولار، پرایمر DNA،۱۰Pcomol/µl با غلظت ۵۰ng/µl و Tag با غلظت ۵u/µl در حجم ۲۵ میکرولیتر مورد استفاده قرار گرفتند. سپس به منظور ارزیابی نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و بررسی حضور یا عدم حضور جایگاه‌های ژنی موردنظر، طول قطعات تکثیر شده، آگاهی از وضعیت ژنتیکی افراد جمعیت از لحاظ صفت مورد نظر، محصولات به دست آمده از PCR توسط ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. توالی پرایمرها و شرایط PCR به ترتیب در جداول ۱، ۲ و ۳ ذکر گردیده است:

جدول ۱- شرایط PCR با پرایمر Ssa7NVH و Ssa94NVH

مراحل	تعداد چرخه	درجه حرارت (°C)	مدت زمان (دقیقه)
واسرشت سازی اولیه	۱	۹۵	۷
واسرشت سازی	۳۰	۹۳	۱
اتصال پرایمر	۳۰	۵۵(Ssa7NVH) – ۵۴ (Ssa94NVH)	۱
بسط آنزیمی	۳۰	۷۲	/۷۵
بسط نهایی	۱	۷۲	۱

www.SID.ir

Archive of SID

توالی یابی

به منظور اثبات و تایید اختصاصی بودن باندهای بدست آمده، چند نمونه از محصولات PCR برای توالی‌یابی اتوماتیک از طریق شرکت فزاپژوه تهران به کشور آلمان ارسال گردید.

نتایج

بررسی حضور یا عدم حضور نشانگر Ssa7NVH و Ssa94NVH در جمعیت

از آنجائیکه اساس برنامه‌های انتخاب مبتنی بر نشانگرها (MAS) بر پایه این مطلب می‌باشد که حضور نشانگر پیوسته با جایگاه ژنی یک صفت بیانگر حضور جایگاه ژنی موردنظر می‌باشد، میزان حضور این نشانگرها در جمعیت نیز نشان دهنده میزان حضور صفت مورد نظر در جمعیت می‌باشد. درصد حضور و یا عدم حضور این نشانگرها در جمعیت مورد بررسی در جدول ۲ ذکر گردیده است.

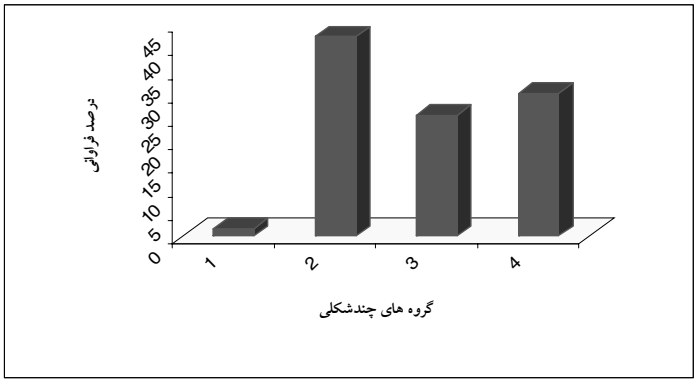
جدول ۲- درصد حضور یا عدم حضور نشانگرها در جمعیت مورد بررسی

نشانگر	حضور باند (درصد)	عدم حضورباند (درصد)
Ssa7NVH	۹۸/۴۹	۱/۵۱
Ssa94NVH	۹۵/۴۶	۴/۵۴

بررسی پلی مرفیسم الل‌های مختلف بر اساس دو نشانگر Ssa7NVH و Ssa94NVH

در جمعیت مورد تحقیق الل‌های مختلف و پلی مرفیسم بالایی برای QTL مقاومت به ویروس IHN در جمعیت رویت شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ۴ هاپلوتیپ مختلف بر اساس نشانگر sa7NVH شامل افراد بدون باند، یک باند (۲ هاپلوتیپ) و دو باند به دست آمده است. همچنین نتایج بدست آمده از واکنش PCR با نشانگر Ssa94NVH حضور ۱۱ هاپلوتیپ متفاوت شامل افراد بدون باند، یک باند (۳ هاپلوتیپ)، دو باند (۳ هاپلوتیپ)، سه باند (۳ هاپلوتیپ) و چهار باند را در جمعیت نشان داد.

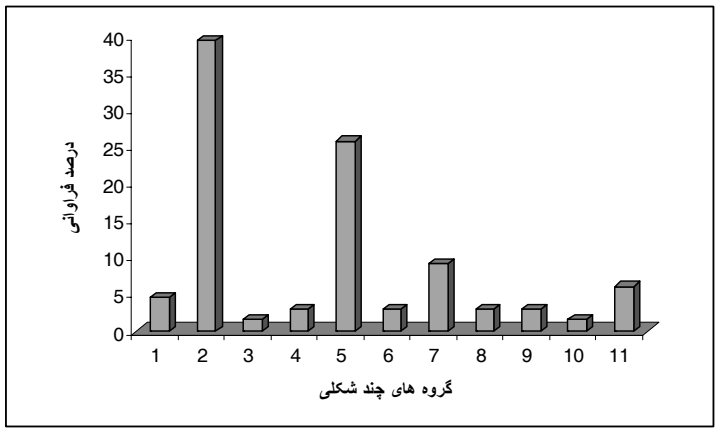
شکل ۳ و ۴ نیز نمونه‌ای از نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر اساس نشانگر Ssa7NVH و نشانگر Ssa94NVH بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد می‌باشد:



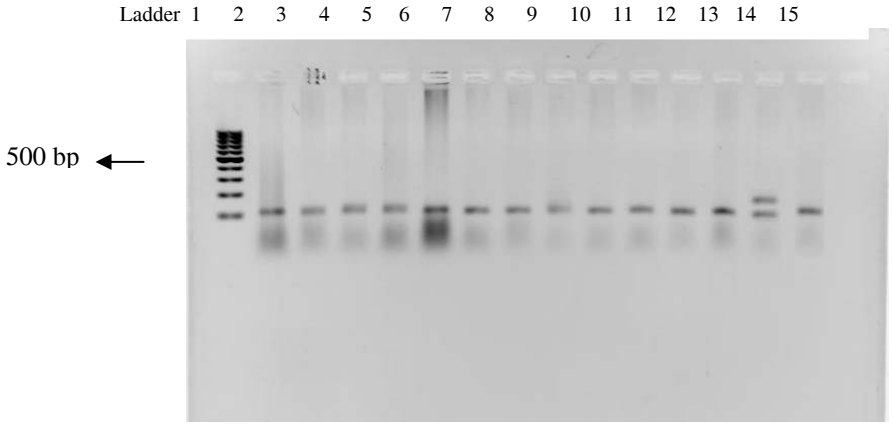
شکل ۱- درصد فراوانی اللی گروه‌های چندشکلی موجود در جمعیت بر اساس نشانگر Ssa7NVH .
۱- بدون باند، ۲- یک باند روی bp ۱۰۰، ۳- یک باند بین bp ۲۰۰-۱۰۰، ۴- دو باند بین bp ۲۰۰-۱۰۰

www.SID.ir

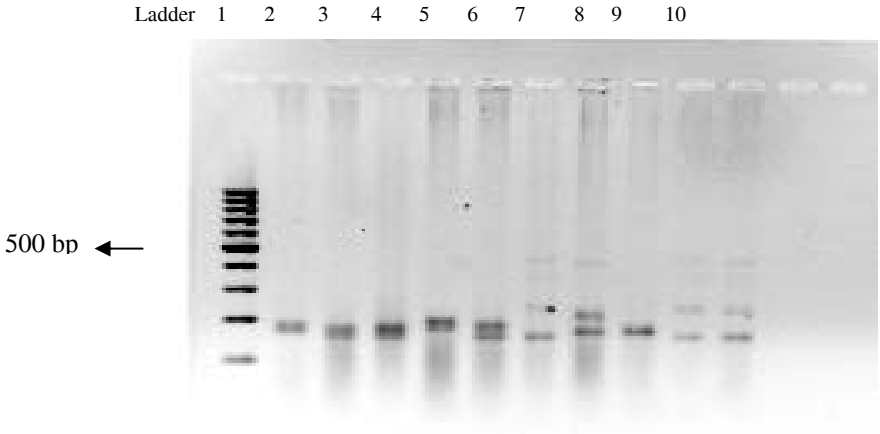
Archive of SID



شکل ۲- درصد فراوانی اللی گروه‌های چندشکلی موجود در جمعیت بر اساس نشانگر Ssa94NVH. ۱- بدون باند، ۲- یک باند بین ۲۰۰bp-۱۰۰، ۳- یک باند بین ۳۰۰bp-۲۰۰، ۴- یک باند روی ۲۰۰bp، ۵- دو باند بین ۲۰۰bp-۱۰۰، ۶- دو باند بین ۳۰۰bp-۲۰۰، ۷- دو باند روی۲۰۰bp-۱۰۰ و ۳۰۰bp-۲۰۰، ۸- سه باند روی ۲۰۰bp-۱۰۰، ۳۰۰bp-۲۰۰ و ۴۰۰bp، ۹- سه باند روی ۲۰۰bp- ۱۰۰، ۳۰۰bp-۲۰۰ و ۵۰۰bp-۴۰۰، ۱۰- سه باند روی ۲۰۰bp-۱۰۰،۲۰۰bp و ۴۰۰bp، ۱۱- چهار باند روی ۲۰۰bp-۱۰۰، ۳۰۰bp-۲۰۰ ،۴۰۰bp-۳۰۰ و ۴۰۰bp.



شکل ۳- واکنش PCR با پرایمرSsa7NVH روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد با اندازه تقریبیbp ۱۰۰.
شماره‌های ۱۵-۱ : افراد مورد آزمایش با هاپلوتیپ های متفاوت



شکل ۴- واکنش PCR با پرایمر Ssa94NVH روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد با اندازه تقریبیbp ۱۰۰.
شماره‌های ۱۰-۱ : افراد مورد آزمایش با هاپلوتیپ های متفاوت

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی وضعیت جایگاه ژنی مقاومت به ویروس IHN بر اساس جنسیت با نشانگرهای Ssa7NVH و Ssa94NVH

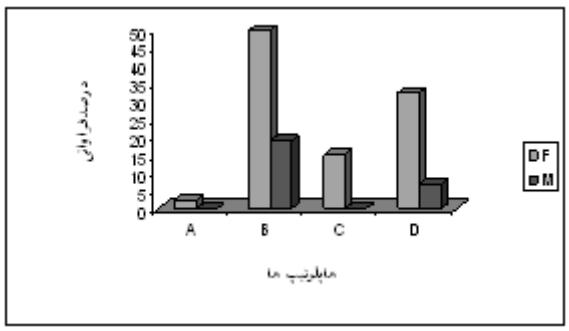
- نشانگر Ssa7NVH و Ssa94NVH

درصد حضور و یا عدم حضور نشانگر Ssa94NVH و Ssa7NVH به تفکیک جنسیت در جدول ۳ ذکر گردیده است:

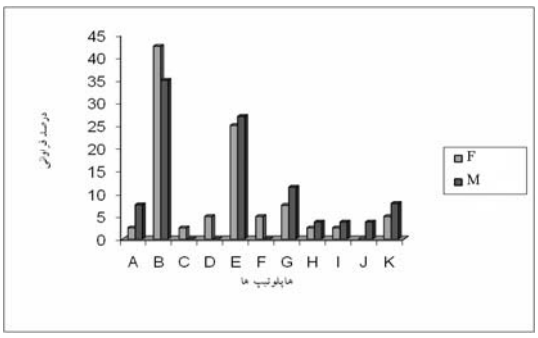
جدول ۳- درصد حضور یا عدم حضور نشانگر Ssa94NVH و Ssa7NVH به تفکیک جنسیت

جنسیت	حضور باند				عدم حضور باند			
	تعداد		درصد		تعداد		درصد	
	Ssa94NVH	Ssa7NVH	Ssa94NVH	Ssa7NVH	Ssa94NVH	Ssa7NVH	Ssa94NVH	Ssa7NVH
ماده	۹۰	۹۰	۹۷/۵	۹۷/۵	۲	۲	۲/۵	۲/۵
نر	۸۵	۹۲	۹۲/۴	۱۰۰	۷	۰	۷/۶	۰

نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تعیین پلی مرفیسم الل های مختلف و درصد حضور آن‌ها در جمعیت بر اساس دو نشانگرSsa7NVH و Ssa94NVH در افراد جمعیت به ترتیب حضور ۴ و ۱۰ هاپلوتیپ مختلف را در جنس ماده و ۲ و ۸ هاپلوتیپ را در جنس نر نشان داد (شکل‌های ۵ و ۶).



شکل ۵- درصد فراوانی هاپلوتیپ‌های مختلف به تفکیک جنسیت بر اساس نشانگر Ssa7NVH



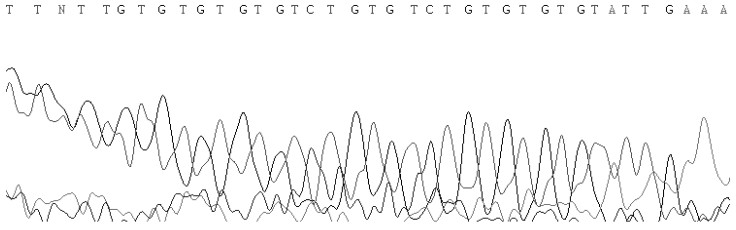
شکل ۶- درصد فراوانی هاپلوتیپ‌های مختلف در جمعیت به تفکیک جنسیت بر اساس نشانگر Ssa94NVH

- توالی یابی محصولات PCR

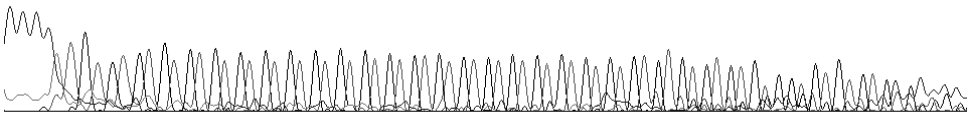
برای اطمینان از اختصاصی بودن باندهای تولید شده، علاوه بر استفاده از واکنش PCR با سختی بالا، چند نمونه از محصولات PCR نیز جهت توالی یابی از طریق شرکت فزاپژوه به کشور آلمان ارسال گردید که نتیجه آن؛ حضور نشانگرهای مورد نظر در جمعیت و محصولات PCR بدست آمده با توالی دی نوکلئوتید $(GT)_{14}$ برای نشانگر Ssa7NVH و $(GT)_{34}$ برای نشانگر Ssa94NVH؛ مورد تایید قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷- توالی ریزماهواره بر اساس نشانگر Ssa7NVH



شکل ۸- توالی ریزماهواره بر اساس نشانگرSsa94NVH

بحث و نتیجه‌گیری

بیماریهای ویروسی در ماهیان ازجمله خطرناکترین بیماریها به شمار می‌روند که تاکنون برای درمان و کنترل آلودگی و شناسایی افراد حامل روش مطمئن و شناخته شده‌ای وجود ندارد. بیماری ویروسی نکروز عفونی خونی (IHN) نیز از جمله‌این بیماریها به شمار می‌رود. هنوز گزارش دقیقی از بروز این بیماری در ایران ثبت نگردیده است، اما با توجه به گستردگی این ویروس در تمام نقاط جهان و قرار گرفتن این بیماری در بین ۵ بیماری که بیش از سایرین تولید آبزیان را تهدید می‌کنند ،ضرورت پیشگیری و شناخت به موقع آن احساس می‌گردد (Winton, 1991).

در طی دهه‌های اخیر، روش‌های ملکولی به علت دقت ،کارایی بالا و سهولت به شکل گسترده‌ای برای تشخیص بیماری‌ها در ماهیان به کار گرفته شده‌اند(Dekkers, 2004). در این تحقیق نیز از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و نشانگر ژنتیکی ریزماهواره به عنوان یکی از روش‌های ملکولی متداول و کارآمد برای بررسی جایگاه‌های ژنی پیوسته با صفت مقاومت به ویروس IHN برای غربالگری جمعیت مولدین قزل آلای رنگین کمان استفاده گردیده است.

جمعیت مولدین قزل آلای رنگین کمان کارگاه کلاردشت متشکل از ۱۱ جمعیت مختلف بوده که در طی سالهای ۱۹۹۶-۱۹۹۰ وارد ایران شده‌اند؛ متاسفانه این جمعیتها به علت عملکرد نامناسب به گونه‌ای در یکدیگر ادغام شده‌اند که هم اکنون نمی‌توان آنها را تفکیک نمود. بنابراین، به نظر می رسد که جمعیت مورد نظر هم اکنون دارای ذخیره ژنتیکی گسترده‌ای بوده و از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار باشد.

در مطالعه رودریگز و همکاران که در سال ۲۰۰۴ بر روی پیوستگی جایگاه ژنی مقاومت به ویروس IHN با تعدادی از نشانگرها از جمله ریزماهواره‌ها انجام شده است پیوستگی بین این QTL با دو ریزماهواره Ssa7NVH و Ssa94NVH تعیین گردید که بر این اساس دو ریزماهواره فوق در نقشه پیوستگی پدری به عنوان دو ریزماهواره پیوسته با صفت مقاومت به ویروس IHN قرار گرفتند. بر اساس این مطالعه؛ میزان پیوستگی این جایگاه‌های ژنی با ریزماهواره Ssa7NVH به میزان ۱۰۰ درصد و پیوستگی با ریزماهواره Ssa94NVH به میزان

www.SID.ir

Archive of SID

۲/۵ سانتی مورگان گزارش گردیده بود که بر طبق این گزارش احتمال حفظ پیوستگی بین جایگاه ژنی موردنظر و دو ریزماهواره Ssa7NVH و Ssa94NVH و در نتیجه حضور جایگاه ژنی مقاوم به ویروس IHN را در جمعیت حاضر افزایش می‌دهد.

بررسی حضور ویا عدم حضور دو نشانگر ریزماهواره پیوسته با صفت مقاومت به ویروس IHN بر روی این جمعیت نشان داد که بر اساس نشانگر Ssa7NVH، ۹۸/۴۹ درصد و بر اساس نشانگر Ssa94NVH، ۹۵/۴۶ درصد از افراد جمعیت مورد مطالعه دارای جایگاه ژنی مورد نظر بوده‌اند که‌این نتیجه بر خلاف انتظار ما از وضعیت جمعیت؛ از لحاظ تنوع ژنتیکی افراد به علت ادغام چندین جمعیت در جمعیت حاضر؛ بوده است که حضور بالای دو نشانگر مذکور در جمعیت با نتایج به دست آمده از مطالعه رودریگز و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت دارد. اما در بررسی جمعیت موردنظر با ریزماهواره‌های پیوسته با صفت مقاومت به ویروس IHN؛ در مطالعه ریزماهواره Ssa94NVH ، ۱۱ هاپلوتیپ و در رابطه با ریزماهواره Ssa7NVH ، ۴ هاپلوتیپ در بین افراد جمعیت مشخص گردید.در نتیجه جمعیت حاضر، از لحاظ حضور و یا عدم حضور جایگاههای ژنی ریزماهواره‌های مورد بررسی از تنوع کمی برخوردار می‌باشد، اما در عین حال حضور هاپلوتیپ های زیاد و تنوع بالای آنها نشاندهنده وجود تنوع بالا در خود نشانگر می‌باشد. ژنهای مقاومت به بیماری‌ها جزو گروههای مجموعه‌های ژنتیکی به نام مجموعه MHC می‌باشند که در مقابله با فشارهای انتخابی بر خلاف سایر ژن‌ها تنوع هاپلوتیپی آنها افزایش می یابد(Borghans *et al*, 2004). از آنجائیکه صفت مورد مطالعه در این تحقیق صفت مقاومت به بیماری است، جزو مجموعه ژنتیکی MHC محسوب می شود. بنابراین؛ با توجه به پیوسته بودن ریزماهواره‌های مورد بررسی با این جایگاه ژنی، مجموعه ژنتیکی MHC مربوطه و ریزماهواره‌های مورد مطالعه تواما به نتاج منتقل می شوند و حضور هاپلوتیپ های زیاد در دو ریزماهواره Ssa7NVH و Ssa94NVH به علت نوترکیبی بالای MHC (Campos *et al*., 2006) می باشد.

با توجه به نشانگرSsa7NVH تعداد هاپلوتیپ های شناسایی شده در جنس ماده(۳ هاپلوتیپ) با توجه به ریزماهواره فوق نسبت به جنس نر (۲ هاپلوتیپ) بیشتر بوده است. همچنین در بررسی حضور یا عدم حضور ریزماهواره Ssa94NVH، ۹۷/۵ درصددر جنس ماده (۱۰ هاپلوتیپ) و ۹۲/۴ درصد در جنس نر (۸ هاپلوتیپ) تعیین گردیده است.

همچنین وجود پلی مرفیسم اللی بیشتر در جنس ماده در بررسی هر دو ریزماهواره مورد استفاده؛ ناشی از نرخ نوترکیبی بالاتر در جنس ماده قزل آلای رنگین کمان می‌باشد (Sakamoto *et al*., 2000) . حضور بالای نشانگرها در هر دو جنس نیز به علت وقوع کراسینگ اور زیاد در نتاج می‌باشد (Danzmann & Gharbi, 2007).

وجود پلی مرفیسم و چند شکلی زیاد یکی از خصوصیات بارز ریزماهواره‌ها می‌باشد که به علت نرخ بالای جهش در این نشانگرها اتفاق می افتد. وجود پلی مرفیسم در توالی ریزماهواره‌ها در بسیاری از مطالعات مشاهده گردیده است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط ساکاموتو و همکاران (۲۰۰۴) بر روی جایگاه ژنی FGT5 توسط ریزماهواره‌ها در ماهی قزل آلای رنگین کمان انجام گرفته است، سه الل متفاوت برای ریزماهواره مورد استفاده در ۹ ماهی قزل آلای رنگین کمان با اندازه‌های ۱۸۰ bp، ۱۹۰bp و ۲۰۶ bp شناسایی گردیده است. همچنین در مطالعه‌ای که توسط مینر و وودراف (Minner & Woodruff, 2000.) انجام گرفت، برای جدایی زیر جمعیت های بس سفید در دریاچه اری از سه نشانگر ریزماهواره استفاده گردید که تنها در یکی از نشانگرهای مورد استفاده پلی مرفیسم اللی مشاهده گردید. حضور هاپلوتیپ های موجود در جمعیت حاضر به علت پدیده کراسینگ اور نابرابر در نمونه‌های هتروزیگوت با تفاوت زیاد در طول قطعات (بیش از ۱۰۰bp) می‌باشد. همچنین پدیده تتراپلوئیدی در آزاد ماهیان (Allendorf & Thorgaard, 1984) و جهش

www.SID.ir

Archive of SID

به ترتیب عامل ایجاد نمونه‌های دارای چهار و سه باندی در جمعیت می‌باشند.

در مجموع؛ حتی با توجه به اثبات حضور این دو ریزماهواره در جمعیت حاضر نیز نمی‌توان از پیوستگی جایگاه ژنی مقاومت به ویروس IHN اطمینان کامل حاصل نمود. به عبارت دیگر ٪۹۷ از افراد جمعیت حضور یکی از نشانگرهای مذکور را نشان داده‌اند، اما این موضوع حاکی از این امر نمی‌باشد که تمامی افرادی که حضور نشانگرها را نشان داده‌اند دارای مقاومت کامل نسبت به ویروس IHN می‌باشند، بنابراین به منظور تایید وتکمیل نتایج بدست آمده از آزمایشات ژنتیکی، نیاز به آزمایشات مواجه با ویروس است تا بتوان به طور همزمان اثرات هاپلوتیپ های متفاوت را از لحاظ میزان مقاومت در برابر بیماری مورد سنجش قرار داد.

در نهایت نتایج بدست آمده از این پژوهش نشاندهنده قابلیت مولدین موجود در کشور برای حضور نشانگر های ریزماهواره پیوسته با صفت مقاومت به ویروس IHN و انتقال آن به نتاج می‌باشد تا بتوان از این اطلاعات در جهت ایجاد خانواده‌ها و لاین های مطلوب از لحاظ مقاومت به ویروس IHN برای اصلاح نژاد کارآمد و موثر گام برداشت.

منابع

- Abdolhay, H. 2005. Comprehensive study of molecular genetic and selective breeding in coldwater fish of Iran. Iranian Fisheries Research Organization, project number: 796.

- Allendorf, F W, and Thorgaard, G H. 1984. Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. Turner, B. J. (ed) In: Evolution of the Salmonid Fishes, Plenum Press, New York, pp. 1–53.

- Bolivar, R. B., Newkirk, G. F., 2002. Response to within family selection for body weight in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a single-trait animal model. Aquaculture 204, 371–381.

- Borghans, J. A., Beltman J. B. , De Boer R. J. .2004. MHC polymorphism under host-pathogen coevolution. Immunogenetics 55, 732-739.

- Campos, J. L. , Posada, D., Mora, P. , 2006. Genetic variation at MHC, mitochondrial and microsatellite loci in isolated populations of Brown trout (*Salmo trutta*), Conservation Genetics (2006) 7:515–530

- Chistiakov¸ D. A., Hellemanas, B., Volckaert, F. A. M., 2006. Microsatellites and their genomic distribution: function and applications: A review with special references to fish genetics. Aquaculture 255, 1-29.

- Clark, M. S. 2003. Genomics and mapping of teleostei (boni fish), Comparative and Functional Genomics 4:182-193.

- Danzmann, R, Gharbi, K. 2007. Aquaculture Genome Technologies, Ed: Liu, Z, Blackwell publishing, UK.

- Dekkers, J. C. M. 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons, Journal of Animal Sciences, 2004. 82 (E. Suppl.): E313–E328.

- Estoup, A, Rodolfo, L, Perrot E, Chourrout, D. 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes, Molecular Marine Biology and Biotechnology 5(4) 295-298.

- FAO, 2007.Yearbook of fisheries statistics summary tables. Available from http://www.fao.org/fi/statist/summtab/default.asp.

www.SID.ir

Archive of SID

- Fjalestad, K. T., Moen, T., Gomez-Raya, L. 2003. Prospects for salmon breeding programmes. Aquacultuer Research in Genetic Technology 34,397-406.
- Goldstein, D. B., Linares, A. R., Cavilli -S forza, L. L. and Feldman, M. W. (1995) An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. Genetics 139, 463-471.
- Liu Z. J. and Cordes, J. F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture, 238, pp. 1–37.
- Minner. J, Woodruff, 2000. DNA Microsatellites to identify white bass stocks in lake Erie. Department of Biological Siences, 84-98.
- Ozaki, A., Sakamoto, T., Khoo, S., Nakamura, K., Coimbra, M. R. M., Akutsu, T., Ok amoto, N., 2000. Quantitative Trait Loci associated with resistance/ susceptibility to IPN in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mol Genet Genomics, (265) 23-31.
- Rodriguez, M. F., Lapatra. S., *et al*, 2004. Genetic markers associated with resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) Backcrosses. Aquacultuer241, 93-115.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F and Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed., Vol. 1-3. Plain View, N. Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sakamoto. T., Danzmann, R. G., Gharbi, K., Howard, P., Ozaki, A., Khoo, S. K., Woram, A., Okamoto, N., Ferguson, M., Holm, L. E., Guyomard, R., Hoyheim, B. 2000. A microsatellite linkage map of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates, Genetics 155: 1331–1345.
- Sakamoto ,T., Okamoto, N. and Ikeda, Y. 2004. Rapid communication: Dinucleotide repeats polymorphism of Rainbow trout, F.G.T. 5l. 1994. Journal of Animal Sciences 72: 2768.
- Smith, G. P. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. Science 191, 528-535.
- Winton, J. R. (1991). Recent advances in the detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in aquaculture. Annual Review of Fish Diseases, 1: 83-93.

www.SID.ir

Archive of SID

Use of microsatellite associated with resistance to IHN virus in screening of Rainbow trout brood stock population (*Oncorhynchus mykiss*)

M, Mohammadtaheri[1], A. Mirvaghefi[2], H. Farahmand[2*], B. Mojazi Amiri[3], N. Ghovati[1] and B. Khalili[4]

[1] M.Sc. graduated in fisheries, Dept. of Fisheries and Environmental Sciences, University of Tehran, I.R.Iran

[2] Assistant Professor in Dept. of Fisheries and Environmental Sciences, University of Tehran, I.R.Iran

[3] Professor in Dept. of Fisheries and Environmental Sciences, University of Tehran, I.R.Iran

[4] M.Sc. in cell and molecular biology, I.R.Iran

(Received: 20 05 2009, Accepted: 28 02 2010)

Abstract

The aim of present study was to screen Rainbow trout broodstock population of Kelardasht Reproduction and Rearing Center, with emphasis on presence and non-presence of Microsatellite markers associated with resistance to IHN virus. For this purpose, 92 samples of caudal fin tissue from Kelardasht Rainbow trout brood stock population were obtained and genomic DNA of these samples were extracted. Two microsatellite loci include Ssa7NVH, Ssa94NVH were amplified using the polymerase chain reaction (PCR) with their specific primers. This study showed that presence of these microsatellite markers in this brood stock population were 98.49%, 95.46% and the number of polymorphs for those were 4, 11 respectively. According to sex-differentiation, the presence of these microsatellite markers based on Ssa94NVH in male and female were 92.4 & 97.5 and based on Ssa7VNH were 100 & 97.5 respectively.

Keywords: Rainbow trout, microsatellite, resistance to IHN virus, genetic screening, marker assisted selection (MAS)

*Corresponding author: Tel: +98 261 2245908 , Fax: +98 261 2245908 , E-mail: vaghefi@nrf.ut.ac.ir

www.SID.ir