



برآورد نسبی پتانسیل‌های ژنتیکی خنثی و تنوع سازشی در جمعیت‌های پرورشی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) کشور

الهام جرفی^{۱،۲}، محمدرضا کلباسی^{۳*}، مجید صادقی‌زاده^۴، سیروس امیری‌نیا^۵

تاریخ دریافت: تیر ۹۵

تاریخ پذیرش: شهریور ۹۵

چکیده

در دهه اخیر، مطالعه نشانگرهای خنثی در برابر انواعی که نماینده تنوع سازشی هستند مورد اقبال قرار گرفته است که شاخص‌ترین آن‌ها، مجموعه ژن‌های MHC است. در مطالعه حاضر نشانگر MHC به همراه ۸ نشانگر ریزماهوره بر روی ۱۳۸ قطعه کپور نقره‌ای در استان‌های مختلف کشور شامل گلستان، مازندران، گیلان، خوزستان و نمونه‌های وارداتی از کشور چین، مورد بررسی قرار گرفت. میانگین غنای اللی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و شاخص شانون به ترتیب برای ریزماهوره‌ها ۵/۰۴، ۰/۶۸۲ و ۱/۳۲ و جایگاه MHC ۴/۲۱، ۰/۶۷۴ و ۱/۲۳ به دست آمد. آنالیز AMOVA در جایگاه‌های ریزماهوره و MHC به ترتیب ۲ و ۳ درصد از واریانس تنوع ژنتیکی را به تفاوت‌های بین جمعیتی اختصاص داد. با اجرای آزمون وضعیت تعادل در جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از مدل SMM، بروز تنگنای ژنتیکی تایید نشد. با توجه به افزایش معنی‌دار هتروزیگوسیتی در هر دو نوع جایگاه در مقایسه با مدل هاردی-وینبرگ و برتری نسبی MHC در ایجاد تمایز بین جمعیت‌ها می‌توان نقش به‌گزینی تعادلی را به این جایگاه نسبت داد. جمع‌بندی نهایی مبین آن است که تنوع اللی جایگاه‌های مذکور در جمعیت‌های مورد بررسی طی چندین دوره تکثیر و پرورش حفظ شده است. غنای اللی بالاتر جایگاه MHC-DAB در میان نمونه‌های چینی در کنار سطح هتروزیگوسیتی و تنوع بالای درون جمعیتی می‌تواند به‌عنوان نقطه‌قوت این گروه به‌شمار آید.

واژگان کلیدی: کپور نقره‌ای، تنوع ژنتیکی، MHC ریزماهوره.

- ۱- دانشجوی دکتری شیلات، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.
- ۲- عضو هیات علمی پژوهشکده آبی‌پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.
- ۳- استاد گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.
- ۴- استاد گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
- ۵- دانشیار سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: kalbassi_m@modares.ac.ir

مقدمه

اندازه موثر جمعیت و الگوهای مهاجرت فراهم کند (Chistiakov et al., 2005). اما نمی‌توانند درباره قدرت سازگاری افراد یا ظرفیت موجود برای تغییرات سازشی اطلاعات مستقیمی را فراهم کنند. از این رو، نوع رابطه میان جایگاه‌های خنثی، تنوع سازشی و سازگاری در میان جمعیت‌ها همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است (Reed and Frankham, 2003). از آنجایی که ماهیان پرورشی در کارگاه‌ها دائماً در معرض پروسه‌های سازش‌پذیری، انتخاب و اهلی‌سازی قرار دارند، بنابراین مطالعه جایگاه‌های ژنی متاثر از نیروی به‌گزینی و بررسی تفاوت‌های ژنتیکی با منشا سازشی در میان جمعیت‌های مختلف می‌تواند اطلاعات مفیدی را ارائه دهند که شاخص‌ترین نماینده این گروه، مجموعه ژن‌های MHC¹ است (Piertney and Oliver, 2006). قابلیت سازگاری با طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا و سطح بالای به‌گزینی در این جایگاه ژنی سبب شده که به عنوان متنوع‌ترین جایگاه کدکننده پروتئینی در میان جانوران به شمار رود (Kelley et al., 2005). شواهد فراوانی دال بر وجود ارتباط بین پلی‌مورفیسم در جایگاه

کارگاه‌های متعددی در ایران ماهی کپور نقره‌ای یا *Hypophthalmichthys molitrix* را تکثیر می‌کنند که غالباً در استان‌های شمالی و جنوب غربی کشور (عمدتاً خوزستان) واقع شده‌اند (سیدمرتضایی و همکاران، ۱۳۸۴). توجه به مسائل ژنتیکی در کارگاه‌های تکثیر همچون حفظ تنوع ژنتیکی و پایش تغییرات آن در سطح جمعیت مولدین، نقش بارزی در فرآیندهای تکاملی جمعیت‌ها همچون انتخاب در برابر شرایط متغیر محیطی (مانند بیماری‌ها) دارد (Bell and Gonzalez, 2009). سطوح پایین تنوع ژنتیکی در یک جمعیت با افزایش احتمال بروز الل‌های مغلوب‌کننده، وقوع هم‌خونی و کاهش شایستگی بقای افراد را به همراه خواهد داشت (Spielman et al., 2004).

یکی از مرسوم‌ترین روش‌ها برای شناسایی تنوع ژنتیکی، ارزیابی ریزماهورها است. این نشانگرهای هم‌بارز با چینش‌های تکراری و کوتاه واقع در مناطق غیرکدکننده DNA، از نظر قدرت به‌گزینی، جایگاهی خنثی محسوب می‌شوند. اگرچه الگوی توزیع فراوانی اللی مشاهده شده در جایگاه‌های ریزماهوره، می‌تواند اطلاعاتی درباره تاریخچه، ساختار و

1- Major Histocompatibility Complex

مداوم در معرض فرآیندهای سازش، انتخاب و اهلی‌سازی قرار دارند، به کار گرفته شود (Karaiskou et al., 2010). بنابراین مطالعه همزمان الگوهای تنوع نشانگرهای خنثی همچون ریزماهورها و تنوع سازشی مثل ژن MHC در میان جمعیت‌های مختلف می‌تواند اطلاعات مفیدی را فراهم کند.

تاکنون مطالعات متعددی درباره وضعیت تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌های بومی ماهی کپور نقره‌ای (رودخانه یانگ‌تسه در کشور چین) با استفاده از روش ریزماهوره و mtDNA صورت گرفته است (Liao et al., 2007; Wang et al., 2008; Li et al., 2011; Mei et al., 2015). همچنین Wei و همکاران (۲۰۱۲) سطح تنوع را در جایگاه MHC Class I $\alpha 2$ در ماهیان کپور نقره‌ای بومی رودخانه‌های چین بررسی کردند. در بسیاری از مطالعات ژنتیکی جمعیت‌های آبزیان کشورمان از روش ریزماهوره استفاده شده است (درافشان و همکاران، ۱۳۸۹؛ Manuel et al., 2010؛ Sourinejad et al., 2010؛ Shirangi et al., 2010؛ al., 2015).

با وجود جایگاه ویژه ماهی کپور نقره‌ای در تولید کپورماهیان کشور که طبق آخرین آمار فائو ۸۵۰۰۰ تن در سال و حدود نیمی از

MHC و مقاومت یا حساسیت در برابر بیماری‌ها در جانوران مختلف از جمله ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*) ارائه شده است (Grimholt et al., 2003). از دیگر عوامل موثر بر تنوع در ژن‌های MHC نیروی به‌گزینی تعادلی است که در بسیاری از گونه‌ها گزارش شده است (Hedrick, 1999) و از طریق ارزیابی عواملی همچون تعادل هاردی-وینبرگ در رابطه با نسبت‌های ژنوتیپی، نسبت‌های مندلی، الگوهای تلاقی بین مولدین و رابطه ژنوتیپ‌ها با صفات تاثیرگذار بر شایستگی بقا قابل بررسی است (خسرویانی و همکاران، ۱۳۹۴؛ Garrigan and Hedrick, 2003). مطالعات نشان داده‌اند که افراد طی فرآیند انتخاب جفت از طریق حس بویایی، نوع MHC طرف مقابل خود را شناسایی کرده، با تشخیص سطح خویشاوندی (خودی از غیرخودی)، به کاهش سطح همخونی کمک می‌کند و نهایتاً سبب بهینه‌سازی تنوع ذخیره ژنی و ظرفیت ایمنولوژیکی نتاج می‌شود (Piertney and Oliver, 2006). بنابراین وجود پلی‌مورفیسم بالا در جایگاه ژنی MHC تحت تاثیر نیروی به‌گزینی می‌تواند به عنوان روشی مناسب برای ذخایر پرورشی که به طور

1- Balancing Selection

کیپورماهیان پرورشی و اختصاصاً کیپور نقره‌ای در ایران است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و استخراج DNA

تعداد ۱۳۸ نمونه باله دمی مولدین کیپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) از کارگاه‌های تکثیر نقاط مختلف کشور شامل استان‌های گیلان (GU) با ۲۷ نمونه (کارگاه تکثیر سیلور کارپ)، خوزستان (KH) با ۳۰ نمونه (کارگاه تکثیر آبی‌گستران امروز اهواز)، مازندران (MZ) با ۲۸ نمونه (کارگاه تکثیر نصر)، گلستان (GS) با ۲۸ نمونه (کارگاه تکثیر ران) و نمونه‌های وارداتی از کشور چین (CH) به تعداد ۲۵ قطعه، به صورت فیکس شده در الکل ۹۶ درصد، جمع‌آوری شد. مراحل استخراج DNA با استفاده از حدود ۳۰ میلی‌گرم باله دمی و روش فنل-کلروفرم (Hillis ۱۹۹۶) با کمی تغییرات انجام شد. نمونه‌ها تا زمان اجرای آنالیزهای بعدی در فریزر 20°C - نگهداری شدند.

آنالیز ریزماهوره‌ها

هشت جایگاه ریزماهوره با شماره‌های دسترسی AM086451، AM086452،

تولید کیپورماهیان کشور را تشکیل می‌دهد (Kalbassi et al., 2012; FAO, 2016).

تاکنون مطالعه‌ای درباره وضعیت تنوع ژنتیکی این گونه در کشورمان صورت نگرفته است. آنچه هم‌اکنون در کارگاه‌های تکثیر کشور به عنوان ذخیره مولدین مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد، جمعیتی محدود از یک بازه ژنتیکی این گونه است، به ویژه آن که از لحاظ جغرافیایی جمعیت‌های بومی آن در کشور ما موجود نیست. در سال‌های اخیر چندین مرحله واردات گله‌های جدید کیپور نقره‌ای از کشور چین به کارگاه‌های مختلف کشور صورت گرفته که اگرچه قدمی مثبت در جهت افزایش تنوع ژنتیکی ذخایر موجود است، اما مسلماً کسب آگاهی دقیق از پتانسیل‌های موجود همراه با داشتن اطلاعات کافی از جمعیت‌های جدید (مثل شناسنامه ژنتیکی) لزوم اجرای یک پایش ژنتیکی را در رابطه با جمعیت‌های کیپور نقره‌ای کاملاً محسوس می‌کند. بر این اساس برآورد نسبی از وضعیت تنوع ژنتیکی ماهی کیپور نقره‌ای در میان کارگاه‌های مختلف کشور با استفاده از دو نمونه نشانگر خنثی (ریزماهوره) و سازشی (MHC) هدف این مطالعه قرار گرفت. این پژوهش اولین مورد بررسی تنوع مجموعه ژن‌های MHC در رابطه با

شدند و ضمن تطبیق با نشانگر وزنی استاندارد به کار رفته در هر ژل (SMOBIO, 50bp)، تایوان) در برنامه Gel Scanner 1.3، اندازه ال‌های به دست آمده برای هر نمونه محاسبه شد.

آنالیز جایگاه ژنی MHC-DAB

واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (با شماره دسترسی Z47757.1 در بانک ژن جهانی) شامل آغازگر رفت $5'-TCTGACATAACTGTAATGCTGC-3'$ و آغازگر برگشت $5'-CAGGAGAGATCAGAGTCTTG-3'$ به منظور تکثیر قطعه اگزون ۲ ژن MHC-DAB به کار گرفته شد (Yu et al., 2013). برای هر واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی بافر 1X، ۲ واحد آنزیم Taq، ۴۰۰ میکرومولار dNTP، همراه با ۰/۲ میکرومولار از هر جفت آغازگر رفت و برگشت (Macrogen، کره)، ۱۰۰ نانوگرم DNA و آب مقطر استریل (تزریقی) تا رسیدن به حجم نهایی، استفاده شد. چرخه‌های دمایی بهینه شامل ۳ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C پس از آن ۳۵ چرخه واسرشته‌سازی در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۹°C به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲°C به مدت

AM086454، AM086455، AM086459، AM086461، AM086462، AM086463 از میان موارد معرفی شده برای کپور نقره‌ای (Gheyas et al., 2006) انتخاب شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از ۲۰ نانوگرم DNA نمونه، در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل بافر 1X (Ampliqon، دانمارک)، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۱ واحد آنزیم Taq، ۰/۴ میلی‌مولار dNTP و ۰/۲ میکرومولار از هر یک از جفت آغازگرها (Macrogen، کره) و آب مقطر استریل (تزریقی) تا رسیدن به حجم ۱۰ میکرولیتر انجام شد. چرخه‌های حرارتی با استفاده از یک دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad، T100، آمریکا)، شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۵۰ ثانیه، مرحله الحاق در دمای ۶۴-۶۰°C (بسته به آغازگر) به مدت ۵۰ ثانیه، مرحله بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۵۰ ثانیه و بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه در هر سری PCR اجرا شد. نمونه‌های به دست آمده از PCR با استفاده از ژل پلی‌اکریلامید ۶ درصد جداسازی و با نیترات نقره طبق روش Benbouza و همکاران (۲۰۰۶) رنگ‌آمیزی

آنالیز داده‌ها

تعداد الل‌های مشاهده شده و غنای اللی (Ar)، هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) با استفاده از برنامه FSTAT 2.9.3 محاسبه شد (Goudet, 2001). آزمون انطباق جمعیت‌ها با تعادل هاردی-وینبرگ و تشخیص انحراف در هر جایگاه با کمک برنامه POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999) همراه با اعمال ضریب تصحیح بونفرونی انجام شد. به منظور مقایسه بین داده‌های به دست آمده از جایگاه‌های ریزماهواره و MHC-DAB سه متغیر تعداد الل، هتروزایگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه^۲ و پس‌آزمون دانکن (در سطح معنی‌داری ۰/۹۵) و احتمال وجود پیوستگی بین جایگاه‌های ریزماهواره و MHC با مقایسه متناظر آن‌ها در برنامه FSTAT بررسی شد. با استفاده از برنامه LOSITAN (Beaumont and Nichols, 1996) مقایسه رابطه بین Fst (شاخص تمایز) و He (هتروزایگوسیتی موردانتظار) و تشخیص انحراف از آنچه طبق مدل جزیره‌ای مهاجرت (مدل

۵۰ ثانیه و نهایتاً بسط پایانی با دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای اطمینان از کیفیت محصول PCR، الکتروفورز در ژل ۱ درصد آگارز انجام شد. به منظور بررسی وضعیت پلی‌مورفیسم این جایگاه ژنی، از روش آنالیز چندرشته‌ای^۱ استفاده شد (Kumari et al., 2015). ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۱۵ میکرولیتر محلول واسرشته‌ساز حاوی ۹ میکرولیتر بافر بارگذاری فرمامید، ۱/۵ میکرولیتر محلول NaOH (۰/۱ مولار) و ۴/۵ میکرولیتر TBE (Tris/Borate/EDTA) ۰/۵ مولار مخلوط شده، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵°C و بلافاصله پس از آن بر روی یخ قرار داده شد. سپس با استفاده از ژل پلی‌اکریلامید ۸ درصد حاوی ۵ درصد گلیسرول به مدت ۱۸ ساعت تحت شرایط استاندارد (جریان ۱۰ ولت به ازای هر سانتی‌متر از ژل و دمای ۴°C) الکتروفورز شد. پس از رنگ‌آمیزی ژل‌ها با توجه به الگوهای نواریندی و مقایسه با نتایج به دست آمده در مطالعات قبلی جایگاه ژنی MHC-DAB (Yu et al., 2013) الل‌های مختلف تعیین شدند.

-
- 2- One-way ANOVA
 - 3- Fixation Index (for Subpopulations within Total Populations)
 - 4- Expected Heterozygosity

-
- 1- Single Strand Conformation Polymorphism

استاندارد برای ریزماهواره) مورد انتظار است، وضعیت جایگاه‌های مورد مطالعه از نظر ماهیت خنثی بودن یا سازشی (تعادلی یا جهت‌دار) بررسی شد. مدل لوسیتان به تعداد ۱۰۰۰۰ مرتبه با فرض مدل جهش پلکانی SMM بر روی جایگاه‌های مورد نظر اجرا شد. به منظور مقایسه بین جمعیت‌ها آماره‌های F به روش Weir و Cockerham (۱۹۸۴) در سطوح مختلف درون و بین‌جمعیتی بر اساس آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) با کمک نرم‌افزار GenAIEx محاسبه شد (Peakall and Smouse, 2012). با استفاده از برنامه Bottleneck 1.2.02، توزیع هتروزیگوسیتی مورد انتظار در یک جمعیت بر اساس تعداد الل مشاهده شده در قالب دو معادله هاردی-وینبرگ و جهش-پیشامد مقایسه شد. از توزیع فراوانی اللی نیز به عنوان یک شاخص که بیانگر مدل پیشامد است، استفاده شد (Luikart and Cornuet, 1998).

نتایج

آنالیز تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها

آنالیز هشت جایگاه ریزماهواره بیانگر وجود پلی‌مورفیسم در میان همه گروه‌های کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)

مورد بررسی بود (جدول ۱). بیشترین غنای اللی (Ar) در میان نمونه‌های خوزستان (۵/۸۵) و کمترین مقدار آن در گیلان (۴/۸۱۸) مشاهده شد. شاخص شانون که بیانگر تنوع درون‌جمعیتی است بیشترین مقدار را در گروه خوزستان نشان داد. در رابطه با جایگاه ژنی MHC-DAB بیشترین مقدار غنای اللی در نمونه‌های وارداتی از چین و کمترین مقدار آن در نمونه‌های مازندران به دست آمد. بیشترین و کمترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار و شاخص شانون در جایگاه MHC به ترتیب به نمونه‌های چینی (۵) و مازندران (۳/۹) تعلق داشت. در همه موارد، مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) بیشتر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) بود.

اجرای PCR بر روی جایگاه کلاسیک MHC-DAB II در ماهی کپور نقره‌ای، تک‌باندی به وزن ۳۵۰bp ایجاد کرد (شکل ۱- الف). آنالیز SSCP در پنج گروه مختلف مجموعاً ۶ الگوی مختلف ژنوتیپی را نشان داد که بر اساس روش Klein و همکاران (۱۹۹۰) نام‌گذاری شدند (شکل ۱- ب).

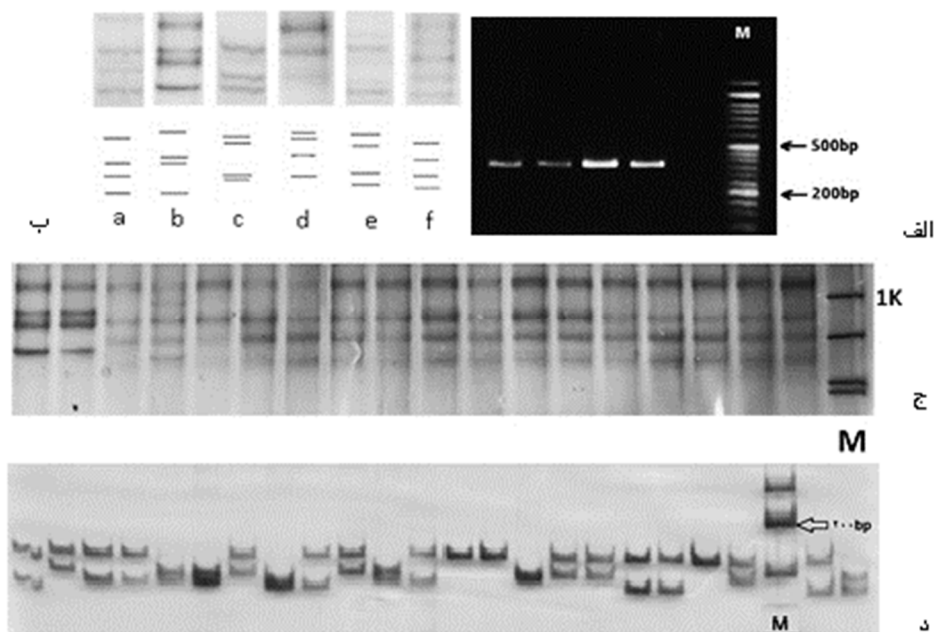
ضریب خویشاوندی درون‌جمعیت (Fis) برای همه جمعیت‌ها و در هر دو گروه نشانگر،

مقادیر منفی را نشان داد که حاکی از وجود تمایز درون جمعیت‌ها است. نتایج اولیه نشان می‌داد که در اغلب موارد داده‌های به دست آمده در نشانگرهای ریزماهوره با جایگاه MHC-DAB شباهت دارند. بنابراین به منظور بررسی دقیق‌تر، آزمون ANOVA یک‌طرفه برای مقایسه سه عامل هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده و غنای الی در بین دو گروه نشانگر انجام شد. اما اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد ($P > 0/05$).

جدول ۱: تنوع الی در جایگاه‌های ریزماهوره و MHC-DAB در پنج گروه کپور نقره‌ای

گروه‌ها					شاخص	نشانگر
چین	مازندران	گلستان	گیلان	خوزستان		
۰/۶۶۵	۰/۶۴۲	۰/۶۹۲	۰/۶۵۱	۰/۶۹۴	He	ریزماهوره
۰/۶۸۲	۰/۶۵۴	۰/۷۰۷	۰/۶۶۴	۰/۷۰۲	uHe	
۰/۸۹۳	۰/۸۴۱	۰/۸۹۷	۰/۹۵۸	۰/۸۹۰	Ho	
۱/۳۰۸	۱/۲۶۹	۱/۳۸۴	۱/۲۲۸	۱/۴۳۶	I	
-۰/۳۵	-۰/۳۱	-۰/۳۰	-۰/۵۲	-۰/۲۷	Fis	
۵	۵/۲۰۱	۵/۳۴۷	۴/۸۱۸	۵/۸۵	Ar	MHC-DAB
۰/۶۸۳	۰/۶۳۷	۰/۶۵۷	۰/۶۵۴	۰/۶۷۶	He	
۰/۶۹۹	۰/۶۴۹	۰/۶۷۱	۰/۶۶۸	۰/۶۸۴	uHe	
۱	۱	۱	۱	۱	Ho	
۱/۳۶۵	۱/۱۴۹	۱/۲۱۰	۱/۱۷۸	۱/۲۶۳	I	
-۰/۴۶	-۰/۵۶	-۰/۵۲	-۰/۵۳	-۰/۴۸	Fis	
۵	۳/۹۸۲	۴	۳/۹۹۹	۴/۵۰۱	Ar	

He: هتروزیگوسیتی مورد انتظار؛ uHe: هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناریب؛ Ho: هتروزیگوسیتی مشاهده شده؛ I: شاخص شانون؛ Fis: ضریب خویشاوندی درون جمعیت؛ Ar: غنای الی.



شکل ۱: الگوی نواریندی در جایگاه‌های ریزماهوره و MHC در ماهی کپور نقره‌ای. الف) محصول الکتروفورز شده جایگاه MHC-DAB ماهی کپور نقره‌ای در ژل آگارز یک درصد. ب) الگوهای ژنوتیپی استخراج شده. ج) نمونه‌ای از آنالیز SSCP جایگاه MHC-DAB (خوزستان). د) نمونه آنالیز جایگاه ریزماهوره (Hmo26) ماهی کپور نقره‌ای (مازندران) در ژل پلی‌اکریلامید و رنگ‌آمیزی نیترا-نقره. M: نشانگر وزنی استاندارد.

از تعادل در میان نمونه‌های خوزستان مشاهده شد که با نتایج سطح هتروزیگوسیتی در این گروه همخوانی داشت. در رابطه با جایگاه MHC-DAB نیز در همه گروه‌ها انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ مشاهده شد.

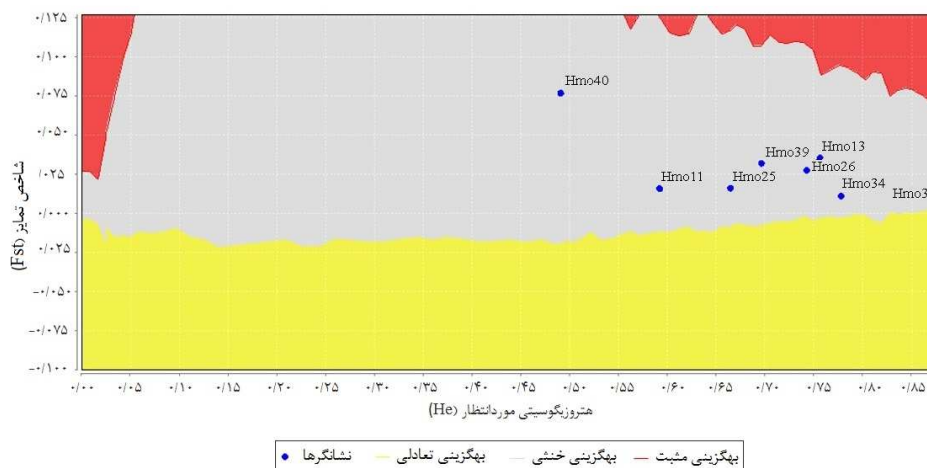
آزمون الگوی هاردی-وینبرگ با استفاده از ریزماهوره‌ها و ژن MHC نشان داد که جایگاه Hmo13 در هیچ کدام از جمعیت‌ها انحرافی نداشت. در مقابل در دو جایگاه Hmo25 و Hmo39 در همه گروه‌ها اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۲). بیشترین تعداد انحراف

جدول ۲: اطلاعات مربوط به انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ در میان جمعیت‌های مختلف مورد بررسی
کیور نقره‌ای در جایگاه‌های ریزماهواره و MHC-DAB

گروه	جایگاه متغیر	Hmo11	Hmo13	Hmo25	Hmo26	Hmo34	Hmo37	Hmo39	Hmo40	MHC
خوزستان	درجه آزادی	۶	۱۰	۱۵	۲۸	۲۱	۴۵	۶	۶	۱۰
	کای اسکور	۴۱	۸/۶۸۳	۷۱/۲۷۷	۴۱/۸۰۰	۸۰/۰۷۸	۷۷/۲۹۲	۶۱/۸۷۳	۶/۸۷۰	۳۱/۲۹
	احتمال	۰/۰۰۰	۰/۵۶۲	۰/۰۰۰	۰/۰۴۵	۰/۰۰۰	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰	۰/۳۳۳	۰/۰۰۰
گیلان	درجه آزادی	۶	۱۰	۶	۱۰	۱۵	۳۶	۱	۳	۶
	کای اسکور	۲۰/۳۱۴	۱۱/۱۰۹	۲۴	۱۸/۹۵۵	۲۴/۲۲۵	۷۲/۰۰۵	۲۴	۲۴	۲۱/۹۱۶
	احتمال	۰/۰۰۲	۰/۳۴۹	۰/۰۰۱	۰/۰۴۱	۰/۰۶۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱
گلستان	درجه آزادی	۶	۶	۱۰	۱۵	۲۱	۴۵	۶	۳	۶
	کای اسکور	۴/۹۲۵	۸/۱۸۸	۴۱/۱۵۸	۳۲/۵۵۹	۳۲/۷۰۵	۴۳/۶۲۳	۱۸/۰۱۸	۳/۱۱۵	۲۳
	احتمال	۰/۵۵۳	۰/۲۲۵	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۵۰	۰/۵۳۰	۰/۰۰۶	۰/۳۷۴	۰/۰۰۱
مازندران	درجه آزادی	۳	۶	۱۵	۲۱	۲۱	۳۶	۶	۳	۶
	کای اسکور	۶/۲۹۸	۱۲/۵۱۳	۸۷	۲۲/۶۵۸	۳۶/۶۴۹	۴۶/۵۵۴	۴۲/۲۲۸	۱/۲۵۹	۲۹
	احتمال	۰/۰۹۸	۰/۰۵۱	۰/۰۰۰	۰/۳۶۲	۰/۰۱۸	۰/۱۱۲	۰/۰۰۰	۰/۷۳۹	۰/۰۰۰
چین	درجه آزادی	۶	۱۰	۳	۱۰	۱۵	۴۵	۶	۳	۱۰
	کای اسکور	۵/۳۱۴	۱۳/۹۰۷	۲۱	۲۶/۰۱۲	۲۰/۴۷۵	۷۱/۶۳۳	۳۱/۱۶۲	۶/۶۷۹	۲۱
	احتمال	۰/۵۰۴	۰/۱۷۷	۰/۰۰۰	۰/۰۰۴	۰/۱۵۴	۰/۰۰۷	۰/۰۰۰	۰/۰۸۳	۰/۰۲۱

این پژوهش از لحاظ خنثی بودن یا تاثیرپذیری از نیروهای سازگار کننده با استفاده از برنامه LOSITAN، کلیه جایگاه‌ها را در محدوده خنثی جای داد (شکل ۲). داده‌های به دست آمده از مقایسه‌های انجام شده در هیچ یک از موارد اختلاف معنی‌دار نداشتند ($P > 0.05$).

نتایج به دست آمده از آزمون عدم تعادل پیوستگی بین جایگاه MHC و ریزماهواره‌ها (۳۶ حالت) در برنامه FSTAT به جز دو حالت از جایگاه‌های ریزماهواره شامل $Hmo13 \times Hmo37$ و $Hmo25 \times Hmo40$ در سایر موارد مقایسه شده اختلاف معنی‌داری به دست نیامد. آزمون جایگاه‌های مورد مطالعه در



شکل ۴: آنالیز جایگاه‌های ریزماهواره با استفاده از نرم‌افزار LOSITAN. هر کدام از نواحی زردرنگ، خاکستری و قرمز به ترتیب بیانگر محدوده‌های به‌گزینی تعادلی (Candidate balancing selection)، خنثی (Candidate neutral) و مثبت (Candidate positive selection) و نقاط آبی‌رنگ نماینده هر کدام از جایگاه‌های ریزماهواره آنالیز شده شامل Hmo11، Hmo13، Hmo25، Hmo26، Hmo34، Hmo37، Hmo39، Hmo40 است. قرارگرفتن جایگاه‌های مذکور در محدوده خاکستری بیانگر خنثی بودن ماهیت آن‌ها است.

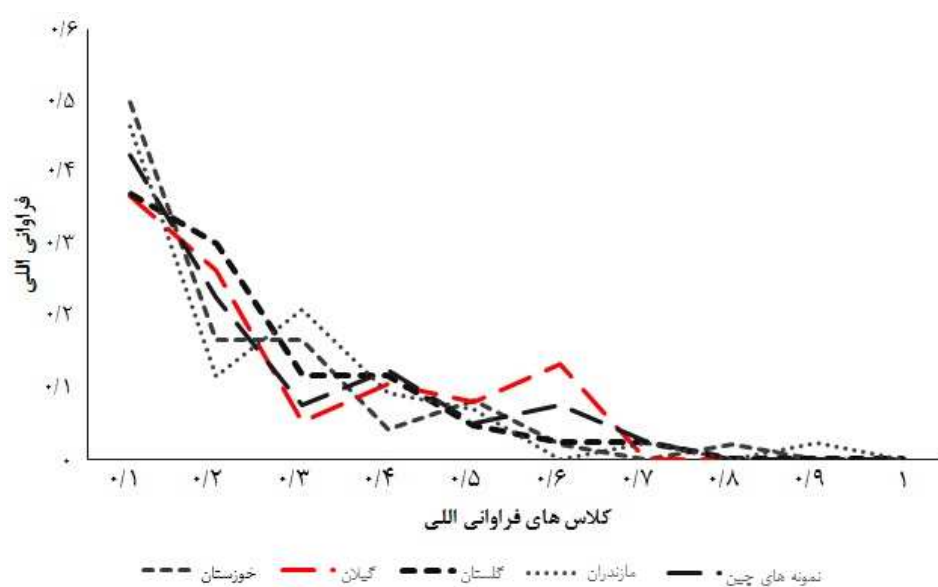
نزدیک به تعادل سهم بالایی از ال‌های با فراوانی کم را داشته باشد، در همه جمعیت‌های مورد بررسی حالت نرمال یا فرم L را ایجاد کرد. بدین ترتیب که بخش اعظم ال‌های دارای فراوانی کم (۰/۱ تا ۰/۱۱، طبقه اول نمودار) بیشترین سهم را به خود اختصاص دادند (شکل ۳). این مدل توزیع به وضوح نشان‌داد که جمعیت‌های مورد بررسی فاقد تنگنای ژنتیکی بودند.

آزمون احتمال وقوع تنگنای ژنتیکی احتمال وقوع تنگنای ژنتیکی در میان پنج جمعیت مورد مطالعه از کپور نقره‌ای در مدل IAM^۱ در تمامی موارد افزایش معنی‌دار هتروزگوسیتی را نشان داد. در مدل SMM^۲ فرض اولیه وجود تعادل جهش-پیشامد درباره همه جمعیت‌ها پذیرفته شد ($P > 0.05$ ؛ جدول ۳). نتایج الگوی تغییرات فراوانی اللی که انتظار می‌رود در جمعیت‌های فاقد تنگنای ژنتیکی و

- 1- Infinite Alleles Model
- 2- Stepwise Mutation Model

جدول ۳: نتایج حاصل از آزمون تعادل جهش - پیشامد به واسطه آزمون فزونی هتروزیگوسیتی به روش ویلکاکسون با استفاده از برنامه Bottleneck

جمعیت	مدل IAM	مدل SMM	الگوی فراوانی الی
خوزستان	۰/۰۰۳	۰/۴۲	(L) نرمال
گیلان	۰/۰۰۱	۰/۰۹	(L) نرمال
گلستان	۰/۰۰۱	۰/۰۲۷	(L) نرمال
مازندران	۰/۰۰۵	۰/۵۷	(L) نرمال
چین	۰/۰۰۱	۰/۱۲۵	(L) نرمال



شکل ۳: مدل تغییرات الی برای جمعیت‌های مختلف مورد بررسی

تفاوت‌های درون‌فردی اختصاص‌داد و تنها ۲

درصد از کل واریانس تنوع به تفاوت‌های
معنی‌دار بین‌جمعیتی تعلق یافت ($P < 0.05$).

ساختار ژنتیکی درون‌جمعیتی

آنالیز AMOVA ۹۸ درصد از واریانس
تنوع ژنتیکی در جایگاه‌های ریزماهواره را به

این مقادیر برای ژن MHC به ترتیب معادل ۹۷ و ۳ درصد به دست آمد که بیانگر دامنه وسیع‌تر تفرق جمعیتی در جایگاه MHC-DAB است (جدول ۴). مقایسه متناظر مقادیر Fst بین جمعیت‌ها در جدول ۴ آورده شده است. Fst در جایگاه MHC-DAB و ریزماهوره‌ها به ترتیب دامنه‌ای بین ۰/۰۰۳ تا ۰/۰۴۸ و ۰/۰۱۱ تا ۰/۰۴۱ داشت که همه داده‌ها اختلاف معنی‌دار نشان دادند ($P < ۰/۰۵$; جدول ۵). در جایگاه MHC-DAB بیشترین و کمترین سطح تمایز

را به ترتیب در میان نمونه‌های مازندران-گیلان و مازندران-گلستان می‌توان مشاهده کرد. برای ریزماهوره‌ها نیز نتیجه مشابهی درباره حداکثر سطح تمایز مشاهده شد (مازندران-گیلان). در حالی که نمونه‌های خوزستان-مازندران کمترین تمایز ژنتیکی را نشان دادند. میانگین کلی ده حالت مقایسه‌ای Fst در گروه‌های مختلف نشان داد که مقدار Fst در جایگاه MHC-DAB (۰/۰۲۴۴) با اختلاف کمی در سطحی بالاتر نسبت به ریزماهوره (۰/۰۲۳۷) قرار داشت.

جدول ۴: آنالیز تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های کپور نقره‌ای به روش AMOVA

منبع تنوع	درجه آزادی	درصد واریانس	معیار	مقدار	احتمال (معنی‌داری)
ریزماهوره	۴	۲	Fst	۰/۰۳	۰/۰۰۰
بین جمعیتی					
درون جمعیتی	۱۳۳	۰	Fis	-۰/۳۱۵	۱
درون فردی	۱۳۸	۹۸	Fit	-۰/۲۷۶	۱
MHC-DAB					
بین جمعیتی	۴	۳	Fst	۰/۰۴	۰/۰۰۱
درون جمعیتی	۱۳۳	۰	Fis	-۰/۴۹۷	۱
درون فردی	۱۳۸	۹۷	Fit	-۰/۴۳۸	۱

Fst: شاخص تمایز؛ Fis: ضریب خویشاوندی درون جمعیت؛ Fit: ضریب خویشاوندی کل.

جدول ۵: مقایسه شاخص F_{st} در میان جمعیت‌های مختلف مورد بررسی (ریزماهورها در نیمه سمت راست بالایی جدول و MHC-DAB در نیمه پایین سمت چپ جدول)

خوزستان	گیلان	گلستان	مازندران	چین	
	۰/۰۲۸*	۰/۰۱۶*	*۰/۰۱۱	۰/۰۲۰*	خوزستان
۰/۰۳۹*		۰/۰۲۶*	۰/۰۴۱*	۰/۰۲۶*	گیلان
۰/۰۲۷*	۰/۰۴۰*		۰/۰۱۸*	۰/۰۲۲*	گلستان
۰/۰۱۹*	۰/۰۴۸*	۰/۰۰۳		۰/۰۱۱*	مازندران
۰/۰۱۶*	۰/۰۳۴*	۰/۰۰۷	۰/۰۲۹*		چین

: موارد دارای اختلاف معنی‌دار با علامت «» مشخص شده‌اند

بحث

Gheyas و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از آغازگرهای مشابه بر روی همین گونه، تنوع ال‌ها در غالب آغازگرها با مطالعه فعلی یکسان بود و برخی اختلاف‌های جزئی به احتمال زیاد ناشی از تفاوت در روش کار است. از آنجایی که غنای ال‌ی بیانگر اندازه موثر جمعیت بوده به ویژه می‌تواند در ارتباط با جمعیت‌هایی که هدف برنامه‌های به‌گزینی یا حفاظتی هستند، به عنوان معیاری کارآمد مورد استناد قرار گیرد. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان‌می‌دهد که جمعیت‌های مورد بررسی توانسته‌اند در طول چندین دوره تکثیر و پرورش در کارگاه‌ها، تنوع ال‌ی موجود در این جایگاه‌ها را حفظ کنند. غنای ال‌ی بالاتر جایگاه MHC-DAB در میان نمونه‌های چینی در

در این پژوهش جایگاه MHC-DAB اگزون ۲ در نمونه‌های کیپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) با استفاده از آغازگرهای معرفی شده برای این قطعه ژنی تکثیر شد و حصول تک‌باند اختصاصی حاصل از واکنش پلی‌مرز (شکل ۱- الف) در بین همه نمونه‌ها تاییدکننده وجود یک جایگاه کلاسیک برای این قطعه ژنی در ماهی کیپور نقره‌ای است. پس از اجرای آنالیز SSCP بر روی MHC-DAB، شش الگوی مختلف نواربندی مشخص شد که با مطالعات قبلی صورت گرفته بر روی این لوکوس مطابقت دارد (Yu et al., 2013). در رابطه با هشت جایگاه ریزماهوره مجموعاً ۴۸ ال‌ به دست آمد که با نتایج

قرار داشتند و در مقابل جایگاه‌های Hmo25، Hmo39 و همچنین MHC-DAB در همه گروه‌ها انحراف معنی‌داری نسبت به معادله هاردی-وینبرگ مشاهده شد. در مطالعه Mei و همکاران (۲۰۱۵) که بر روی پنج گروه از جمعیت‌های طبیعی ماهی کپور نقره‌ای با استفاده از ده جایگاه ریزماهواره در رودخانه یانگ‌تسه انجام شد نیز برخی از جایگاه‌ها در میان سه جمعیت، از تعادل هاردی-وینبرگ انحراف نشان داد. با وجود محدودیت جمعیت‌های کارگاهی از نظر روش تکثیر و تلاقی‌های غیرتصادفی، اختلاط بین جمعیت‌های مختلف، نسبت‌های نابرابر جنسی بروز پدیده‌های برهم‌زننده تعادل همچون رانش ژنتیکی، به‌گزینی، جریان ژنی و با احتمال کمتر جهش دور، از انتظار نیست. از این رو، عموماً این انحراف از تعادل در میان آبزیان پدیده‌ای رایج است (Waples, 2015).

آزمون تعادل پیشامد-جهش در مدل IAM در همه جمعیت‌ها اختلاف معنی‌داری را برای فزونی هتروزیگوسیتی نشان داد در حالی که در مدل SMM گروه‌های مورد بررسی دارای تعادل بودند ($P > 0.05$). از آنجایی که مدل IAM تعادل در تنوع ژنی را در سطوح پایین‌تری نسبت به مدل SMM پیش‌بینی

کنار سایر عوامل همچون سطح هتروزیگوسیتی و تنوع بالای درون‌جمعیتی (شاخص شانون) می‌تواند به عنوان نقطه قوت این مجموعه وارداتی به کشور محسوب شود. در میان سایر گروه‌ها اگرچه نمونه‌های خوزستان در هر دو نوع نشانگر بالاترین غنای اللی را نشان می‌داد اما با توجه به هم‌ترازی نسبی غنای اللی MHC-DAB در جمعیت‌های گلستان، مازندران و گیلان و برتری هرچند جزئی نمونه‌های خوزستان نسبت به این سه گروه می‌توان احتمال وقوع فرآیندهای سازشی به واسطه شرایط منطقه‌ای اعم از محیط، عوامل بیماری‌زا و یا حتی جغرافیایی را درباره این جمعیت مطرح کرد. با توجه به تعامل مستقیم جایگاه ژنی MHC-DAB با عوامل بیماری‌زا، شواهد فراوانی دال بر تاثیر عواملی همچون مختصات جغرافیایی و به دنبال آن دمای محیط بر میزان تنوع اللی در این جایگاه گزارش شده است (Dionne et al., 2007). اگرچه برای بررسی این فرضیه نیاز به مطالعات گسترده‌تر است.

بررسی الگوی تعادل در جمعیت‌ها امکان ارزیابی و تشخیص تغییرات ژنتیکی را مقدور می‌سازد. نتیجه آزمون کای‌اسکور نشان داد که همه جمعیت‌ها در جایگاه Hmo13 در تعادل

معنی داری بین نمونه‌ها مشاهده نکردند و آن‌ها را به صورت یک جمعیت واحد فرض کردند. حال آن که در مطالعه Wei و همکاران (۲۰۱۲) ضمن مشاهده تنوع بالای جایگاه ژنی MHC در میان نمونه‌های مورد بررسی، بیشترین شباهت و اختلاف درون‌گروهی به ترتیب در نمونه‌های می‌سی‌سی‌پی و یانگ‌تسه به دست آمد. ضمن آن که آنالیز توالی‌های بررسی شده بیانگر بیشترین شدت به‌گزینی در این جایگاه ژنی در میان نمونه‌های رودخانه یانگ‌تسه در مقایسه با نمونه‌های غیربومی بوده است. پس از آنالیز فراوانی‌های اللی به دست آمده از تنوع ژنی MHC، حصول نتایجی همچون افزایش هتروزیگوسیتی در مقایسه با نسبت‌های ژنوتیپی مورد انتظار در معادله هاردی-وینبرگ یا برتری نسبی در سطح تنوع و تمایز ژنتیکی این جایگاه در مقایسه با نشانگرهای خنثی می‌تواند دال بر به‌گزینی تعادلی در جایگاه MHC باشد (Garrigan and Hedrick, 2003). نتایج مطالعه حاضر درباره جایگاه MHC-DAB با توجه به شواهدی همچون افزایش هتروزیگوسیتی در مقایسه با مدل هاردی-وینبرگ و مدل مورد انتظار در تعادل جهش-پیشامد ژنتیکی و برتری هرچند اندک، نسبت به جایگاه‌های ریزماهواره در ایجاد تمایز

می‌کند، بنابراین احتمال تشخیص افزایش هتروزیگوسیتی معنی‌دار در این مدل بیشتر است (Thiruvankadan et al., 2014). گروه‌های مورد بررسی در این مطالعه تحت مدل محافظه‌کارانه‌تر SMM انحرافی نشان ندادند، بنابراین فاقد تنگنای ژنتیکی ارزیابی می‌شوند. با این وجود، معمولاً انحراف از مدل مذکور با کاهش هتروزیگوسیتی در جمعیت‌ها همراه است (Mahmoudi et al., 2012). علاوه بر این، نتیجه حاصل از الگوی به دست آمده برای فراوانی اللی در همه جمعیت‌ها نیز با تعادل جهش-پیشامد مطابقت داشت.

آنالیز AMOVA در رابطه با ریزماهواره و جایگاه MHC-DAB نشان داد که به ترتیب دو و سه درصد از این واریانس به تفاوت‌های بین‌جمعیتی بازمی‌گردد. میانگین Fst در ریزماهواره‌ها و MHC-DAB به ترتیب دارای میانگینی معادل ۰/۰۳ و ۰/۰۴ در میان کل گروه‌ها بود که با توجه به معیارهای اعلام شده قبلی (سطح اول تمایز: ۰ تا ۰/۰۵؛ Wright, 1987) نشان دهنده سطح کم تمایز ژنتیکی بین گروه‌های مورد مطالعه است. Mei و همکاران (۲۰۱۵) نیز با وجود تنوع بالای مشاهده شده در ریزماهواره‌های مورد بررسی در میان گروه‌های مختلف کیپورنقره‌ای، تمایز

نقره‌ای است. در این ارتباط بالاتر بودن غنای اللی در نمونه‌های وارداتی از چین ضمن آن که نکته‌ای مثبت برای ذخایر کپور نقره‌ای کشور تلقی می‌شود اما در عین حال لزوم اجرای پایش‌های گسترده‌تر برای ارزیابی جامع‌تر از سرمایه‌های ژنتیکی موجود (تهیه شناسنامه اختصاصی)، پژوهش درباره ارتباط احتمالی ال‌های مختلف این جایگاه با مقاومت در برابر بیماری‌ها و مسائل رفتارشناسی در پرورش تکثیر برای بهره‌برداری بهینه و هدفمند از ذخایر موجود را بارزتر می‌کند. با توجه به اهمیت حضور یک بازه اللی متنوع و سطح هتروزیگوسیتی بالا برای افزایش شایستگی بقا در میان جمعیت‌ها، هویت این تنوع چه از نوع ریزماهوره با ماهیتی خنثی و چه در ارتباط با جایگاهی سازشی همچون MHC باشد، مجموعاً توانایی سازگاری طولانی‌مدت و کوتاه‌مدت را برای یک فرد رقم می‌زند. بنابراین مطالعه همزمان این دو جایگاه برای برآوردی دقیق‌تر پتانسیل‌های ژنتیکی جمعیت‌ها توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به کلیه افرادی که در تامین نمونه‌های این پژوهش ما را یاری کردند، ابراز می‌دارند.

بین جمعیت‌ها، فرضیه فوق را تایید می‌کند. گروهی از پژوهشگران با توجه به تاثیر جایگاه ژنی MHC در رفتارهای انتخاب جفت مولدین با محوریت افزایش شایستگی بقا در فرزندان، نسبت به پیامدهای مثبت بهره‌گیری از روش‌های تکثیر مبتنی بر فراهم کردن شرایط انتخاب تاکید کرده‌اند (Charge et al., 2014). روش تکثیر نیمه‌طبیعی به ویژه در یک دهه اخیر در کپور نقره‌ای به عنوان روش مرسوم در کارگاه‌های کشور مورد استفاده قرار گرفته است و به نظر می‌رسد شرایط مناسب جمعیت‌های این گونه در کشورمان متاثر از نتایج مثبت این فرآیند باشد. بنابراین در جمع‌بندی نهایی با توجه به نتایج مطالعه حاضر، مبنی بر حصول غنای اللی مناسب در میان جمعیت‌های کپور نقره‌ای مورد بررسی، به نظر می‌رسد هشت جایگاه اختصاصی ریزماهوره در این پژوهش توانسته است برآورد مناسبی از وضعیت تنوع ژنتیکی گروه‌های مورد مطالعه را به دست دهد و جهت مطالعات بعدی در این گونه مورد تایید قرار می‌گیرد. همچنین نتایج ارزیابی تنوع ژن MHC در میان گروه‌های مختلف که موید وضعیت به‌گزینی در این جایگاه بود گویای توانایی ویژه آن برای ارزیابی قابلیت‌های سازشی در میان جمعیت‌های کپور

منابع

- دو گونه اقتصادی آزادماهیان ایران. مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۳(۱): ۸۵-۹۳.
- سیدمرتضایی س.ر.، جرفی ا. و جعفریان ا. ۱۳۸۴. ارزیابی مدیریت ژنتیکی در کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان گرم‌آبی جنوب و جنوب غرب ایران. مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی ایران. ۶۴ص.
- خسرویانی ک.، کلباسی م. و صادقی‌زاده م. ۱۳۹۴. ارزیابی ژن MHC-class II α در ماهی آزاد دریای‌خزر (*Salmo trutta caspius*) به روش SSCP. فصلنامه محیط زیست جانوری، ۷(۱): ۷-۱۳.
- درافشان س.، کلباسی م.، پورکاظمی م. و مجازی‌امیری ب. ۱۳۸۹. کاربرد نشانگر ریزماهوره در بررسی صحت آمیخته‌گری بین Veterinariay Zootecnia Cordoba, 16 (2): 2491-2498.
- Charge R., Teplitsky C., Sorci G. and Low M. 2014. Can sexual selection theory inform genetic management of captive population? A review. Evolutionary Applications, 7: 1120-1133.
- Chistiakov D.A., Hellemans B., Haley C.S., Law A.S., Tsigenopoulos C.S., Kotoulas G., Bertotto D., Libertini A. and Volckaert F.A. 2005. A microsatellite linkage map of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. Genetics, 170: 1821-1826.
- Dionne M., Miller M.K., Dodson J.J., Caron F. and Bernatchez L. 2007. Clinal variation in MHC diversity with temperature: Evidence for the role of host-pathogen interaction on local adaptation in Atlantic salmon. Evolution, 61(9): 2154-2164.
- Beaumont M.A. and Nichols R.A. 1996. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. Proceedings of the Royal Society of London B, 263: 1619-1626.
- Bell G. and Gonzalez A. 2009. Evolutionary rescue can prevent extinction following environmental change. Ecology Letters, 12: 942-948.
- 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.
- Brinez B., Caraballo O.X. and Salazar V.M. 2011. Genetic diversity of six populations of red hybrid tilapia, using microsatellite genetic markers. Medicina

- FAO. 2016.** Fisheries and Aquaculture Software. FishStatJ-software for fishery statistical time series. Retrieved June, 2016, from <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>.
- Garrigan D. and Hedrick P.W. 2003.** Detecting adaptive molecular polymorphism: Lessons from the MHC. *Evolution*, 57: 1707–1722.
- Gheyas A.A., Cairney M., Gilmour A.E., Sattar M.A., Das T.K., McAndrew B.J., Penman D.J. and Taggart J.B. 2006.** Characterization of microsatellite loci in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and cross-amplification in other cyprinid species. *Molecular Ecology Notes*, 6: 656–659.
- Goudet J. 2001.** FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices version 2.9.3. Retrieved January 12, 2016, from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Grimholt U., Larsen S., Nordmo R., Midtlyng P., Kjøglum S., Storset A., Sæbo S. and Stet R.J.M. 2003.** MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci. *Immunogenetics*, 55: 210–219.
- Hedrick P.W. 1999.** Balancing selection and MHC. *Genetica*, 104: 207–214.
- Hillis D.M., Moritz C. and Mable B.K. 1996.** *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland. 655P.
- Kalbassi M.R., Abdollahzadeh E. and Salari-Joo H. 2012.** A review on aquaculture development in Iran. *Journal of Ecopersia*, 1(2): 159–178.
- Karaïskou N., Moran P., Georgitsakis G. and Abatzopoulos T.J. 2010.** High allelic variation of MHC class II alpha antigen and the role of selection in wild and cultured *Sparus aurata* populations. *Hydrobiologia*, 638: 11–20.
- Kelley J., Walter L. and Trowsdale J. 2005.** Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics*, 56: 683–695.
- Klein J., Bontrop R.E., Dawkins R.L., Erlich H.A., Gyllenstein U.B., Heise E.R., Jones P.P., Parham P., Wakeland E.K. and Watkins D.I. 1990.** Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: A proposal. *Immunogenetics*, 31(4): 217–219.
- Kumari N., Thakur S.K., Kumar D. and Kumari K. 2015.** Single strand conformation polymorphism (SSCP)-A Review. *Indian Research Journal of Genetic and Biotechnology*, 7(1): 27–34.
- Li S.F., Xu J.W., Yang Q.L., Wang C.H., Chapman D.C. and Lu G.**

- 2011.** Significant genetic differentiation between native and introduced silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) inferred from mtDNA analysis. *Environmental Biology of Fishes*, 92: 503–511.
- Liao M., Yang G., Wang X., Wang D., Zou G. and Wei Q. 2007.** Development of microsatellite DNA markers of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and their cross-species application in bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Molecular Ecology Notes*, 7: 95–99.
- Luikart G. and Cornuet J.M. 1998.** Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 12: 228–237.
- Mahmoudi B., Esteghamat O., Sharhriyar A. and Babayev S.M. 2012.** Genetic characterization and bottleneck analysis of Korbi Jobnub Khorasan goats by microsatellite markers. *Journal of Cellular and Molecular Ecology*, 10: 61–69.
- Manuel V., Sourinejad I., Bouza C., Vilas R., Pino-Querido A., Kalbassi M.R. and Martinez P. 2010.** Phylogeography, genetic structure, and conservation of the endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877), from Iran. *Hydrobiologia*, 664(1): 51–67.
- Mei X.P., Xiao M.Y. and Jin G.T. 2015.** The microsatellite analysis of genetic diversity of five silver carp populations in the three Gorges reservoir of the Yangtze River. *ACTA Hydrobiologica Sinica*, 39(5): 869–876.
- Peakall R. and Smouse P.E. 2012.** GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- Piertney S.B. and Oliver M.K. 2006.** The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*, 96: 7–21.
- Reed D.H. and Frankham R. 2003.** Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, 17: 230–237.
- Shirangi A., Kalbassi M.R. and Dorafshan S. 2010.** Microsatellite polymorphism reveals low genetic differentiation between fall and spring migratory forms of endangered Caspian trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1870). *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 9(1): 9–16.
- Sourinejad I., Kalbassi M.R. and Martinez P. 2015.** Mixed mit fertilization of endangered Caspian brown trout *Salmo trutta caspius* influences effective population size of breeders. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(2): 393–408.

- Spielman D., Brook B.W. and Frankham R. 2004.** Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(42): 15261–15264.
- Thiruvankadan A.K., Jayakumar V., Kathiravan P. and Saravanan R. 2014.** Genetic architecture and bottleneck analyses of Salem Black goat breed based on microsatellite markers. *Veterinary World*, 7: 733–737.
- Wang C.Z., Liang H.W., Zou G.W., Luo X.Z., Li Z., Tian H. and Hu G.F. 2008.** Genetic variation analysis of two silver carp populations in the middle and upper Yangtze River by microsatellite. *Yi Chuan*, 30(10): 1341–1348.
- Waples R.S. 2015.** Testing for Hardy-Weinberg proportion: Have we lost the plot? *Journal of Heredity*, 106(1): 1–19.
- Wei F., ZhiZhi L., Sifa L., XueSong L., WenQiao T. and JinQuan Y. 2012.** The analysis of genetic variation among Yangtze River and introduced populations from America and Hungary of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by major histocompatibility complex (MHC). *Journal of Shanghai Ocean University*, 21(5): 684–692.
- Weir B. and Cockerham C. 1984.** Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38 (6): 1358–1370.
- Wright S. 1978.** *Evolution and the genetics of population's variability within and among natural populations.* University of Chicago Press, Chicago. 590P.
- Yeh F.C., Yang R.C. and Boyle T. 1999.** POPGENE version 1.32, Available from: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>.
- 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.



A comparison to neutral and adaptive genetic diversity of cultured populations of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in Iran

Elham Jorfi^{1,2}, Mohammad Reza Kalbassi^{3*}, Majid Sadeghzadeh⁴, Cirous Amirinia⁵

Received: July 2016

Accepted: September 2016

Abstract

During the last decade studying of adaptive markers in contrast to neutral types, have been welcomed. The most famous member of these genes, MHC, along with 8 microsatellites was analyzed in spatial groups (138 individuals) of silver carp from different provinces including Golestan, Mazandaran, Guilan, Khouzestan in addition to line samples imported from China. Mean allelic richness, expected heterozygosity and Shannon Index estimated for microsatellites as 5.04, 0.682 and 1.32, and MHC as 4.21, 0.674 and 1.23, respectively. About 2% and 3% of differentiation among populations was observed for microsatellites and MHC respectively. No significant bottleneck signals were detected in all of studied populations. Given to significant excess heterozygosity revealed in both of MHC and microsatellites in contrast to hardy-Weinberg model and proportional higher degrees of differentiation between populations in MHC, a balancing selection function can be attributed to this locus. Finally, it can be concluded that studied populations in this research have been able to maintain their genetic diversity in these loci through several stages of propagation in the hatcheries. Higher allelic richness of MHC-DAB loci in Chinese samples beside high levels of heterozygosity and diversity within population can be considered as the strength of this group.

Key words: *Silver Carp, Genetic Diversity, MHC, Microsatellites.*

1- Ph.D. Student in Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

2- Scientific Member in Aquaculture Research Center, South of Iran, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahwaz, Iran.

3- Professor in Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

4- Professor in Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

5- Associate Professor in Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

*Corresponding Author: kalbassi_m@modares.ac.ir