ارزیابی ژن MHC-class IIα درماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) به‌روش SSCP

- **کاوه خسرویانی:** گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، صندوق پستی: ۳۵۶-۴۶۴۱۴
- **محمدرضا کلباسی*:** گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، صندوق پستی: ۳۵۶-۴۶۴۱۴
- **مجید صادقی‌زاده:** گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، صندوق پستی: ۱۷۵-۱۴۱۱۵

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۲

چکیده

مولکول‌های MHC در مهره‌داران نقش‌مهمی در عملکردسیستم ایمنی اکتسابی داشته و ارزیابی اثرات انتخاب طبیعی و رانش ژنی بر تنوع ژنوم MHC گونه‌های مختلف بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در این مطالعه تنوع ژنوم MHCگونه بومی و در معرض انقراض ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) که مورد حمایت برنامه‌های بازسازی ذخایر می‌باشد، مورد بررسی قرار گرفت. ازاین‌رو تنوع جایگاه DAA ژن MHC کلاس IIα در ۵۰ نمونه ماهی آزاد دریای خزر با استفاده از روش SSCP بررسی شد. نتایج تحقیق نشان می‌دهد که این ژن حداقل واجد ۱۵ الل می‌باشد که الل‌های MHCScCa-DAA*03 و MHCScCa-DAA*10 دارای بیش‌ترین فراوانی می‌باشند. هم‌چنین هتروزایگوسیتی مشاهده شده (HO)، مورد انتظار (He) و شاخص شانون به‌ترتیب برابر ۰/۸۰، ۰/۸۲ و ۲/۰۳۷ می‌باشد. در جمع‌بندی باید بیان کرد، علی‌رغم تنوع بالای ژنوم MHC در ماهی آزاد دریای خزر، ولی با توجه به وضعیت حفاظتی در حال انقراض و دستکاری‌های انسانی، بسیاری از الل‌هایی که فراوانی پایین دارند در خطر از دست رفتن می‌باشند. ازاین‌رو توجه به حفظ تنوع این ژنوم طی برنامه‌های بازسازی ذخایر ماهی آزاد دریای خزر حائز اهمیت می‌باشد.

کلمات کلیدی: ماهی آزاد دریای خزر، ژنوم MHC، روش SSCP، تنوع ژنتیکی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: kalbassi_m@modares.ac.ir

مقدمه

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmotruttacaspius*) تنها گونه از خانواده آزاد ماهیان (Salmonidae) دریای خزر می‌باشد، که از شاخه دانوبی قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta*) منشا گرفته است(Bernatchez، ۲۰۰۱). پراکنش این گونه در ضلع جنوب غربی دریای خزر می‌باشد و با توجه به رفتار رودکوچی این ماهیان در فصل تولیدمثل (اواخر پاییز تا اوایل بهار) وارد رودخانه‌هایی چون سردابرود، چشمه کیله، کرگانرود و غیره شده و پس از گذراندن مراحل تکوین لاروی به دریا بازمی‌گردند (Kheyrandish و همکاران، ۲۰۱۰). با توجه به خوش‌خوراکی و بازارپسندی بالا و هم‌چنین کاهش ذخایر در اثر صیدبی‌رویه، آلودگی دریای خزر و عدم امکان تکثیر رودخانه‌ایی، این گونه دارای اهمیت اقتصادی و زیست‌محیطی بالایی است (Niksirat و Abdoli، ۲۰۰۹؛ Kiabi و همکاران، ۱۹۹۹) و برای بازسازی ذخایر این ماهی سالانه بالغ بر ۵۰۰ هزار قطعه بچه‌ماهی به دریا رهاسازی می‌شود (IranFisheries، ۲۰۱۰). با توجه به کاهش شدید تکثیر طبیعی و مشکلات اشاره شده، ذخایر این گونه به‌شدت کاهش یافته و در لیست قرمز IUCN قرار گرفته است و همواره به مقدار بازسازی شده سالیانه از طریق تکثیر مصنوعی مولدین وابسته می‌باشد (IUCN، ۲۰۱۲؛ Kiabi و همکاران، ۱۹۹۹). از آن‌جایی‌که در مراحل مختلف بازسازی ذخایر ماهی آزاد از مرحله صید مولدین از رودخانه، تکثیر مصنوعی مولدین نر و ماده، نگه‌داری بچه ماهی‌ها در شرایط پرورشی تا رهاسازی لارو ۱۰-۱۵ گرمی به دریا، ممکن است انواع به‌گزینی تصادفی و عمدی رخ دهد، لذا توجه به مدیریت براساس حفظ ذخایر ژنتیکی به‌جای مدیریت براساس اصول آماری در مورد این گونه بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

تنوع ژنتیکی بالا پتانسیل جمعیت‌ها در مقابله با عوامل تنش‌زا مثل انگل‌ها، بیماری‌ها و تغییرات زیست‌محیطی را افزایش می‌دهد (Frankham و همکاران، ۲۰۰۲). استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA در ارزیابی و پایش تغییرات ژنتیکی جمعیت‌های جانوری کاربردهای وسیعی دارند به‌طوری‌که نشانگرهای خنثی چون میکروستلایت (Microsatellite) و چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) در بیش‌تر مطالعات مورد استفاده قرار می‌گیرد (Allendorf و Luikart، ۲۰۰۷). با توجه به این‌که این نشانگرها با شرایط محیطی ارتباط مستقیم ندارند، نمی‌توانند به خوبی گویای اثرات ناشی از فشار به‌گزینی محیطی باشند، ازاین‌رو امروزه از ژن‌های عملکردی که مرتبط با شایستگی زیستی گونه‌ها باشند، استفاده می‌شود (Bernatchez و Landry، ۲۰۰۳). یکی از ژن‌های قابل بررسی مهم، مجموعه ژنی MHC (Major Histocompatibility Complex)می‌باشد که ارتباطات مستقیم و غیرمستقیم متعددی با شایستگی زیستی درمهره‌داران دارد (Ujvari و Belov، ۲۰۱۱؛ Bernatchez و Landry، ۲۰۰۳).

در واقع ژن‌های MHC مرتبط با سیستم ایمنی اکتسابی و یکی از متنوع‌ترین ژنوم کدکننده پروتئین در میان مهره‌داران هستند و یکی از مناسب‌ترین ژن‌های کاندید برای بررسی سازگاری تکاملی جانوران می‌باشند (Hedrick، ۱۹۹۴). ژن‌های MHC دو دسته اصلی گلیکوپروتئین‌های سطح سلولی کلاس I و II را کد می‌کنند که مسئول تحویل دادن پپتیدهای خودی و غیرخودی به لنفوسیت‌های T می‌باشند. مولکول‌های MHC کلاس I پپتیدهای داخل سلولی را به سلول‌های T کشنده نوع $CD8^+$، ولی MHC کلاس II پپتیدهای خارج سلولی را به لنفوسیت‌های T کمکی نوع $CD4^+$ تحویل می‌دهند (Rammensee، ۱۹۹۵). بیش‌ترین تنوع این ژنوم به اگزون‌های کدکننده ناحیه گیرنده پپتید PBR (Peptide-binding region) مربوط می‌شود که در ژن MHC کلاس I توسط اولین و دومین اگزون و در MHC کلاس II توسط دومین اگزون این ژن ساخته می‌شود(Consuegra و همکاران، ۲۰۰۵؛ Shum و همکاران، ۲۰۰۱). ژن‌های MHC در آزادماهیان با استفاده از روش‌های مختلفی آنالیز شده است که از آن‌جمله، تعیین توالی نوکلئوتیدی (Miller و Withler، ۱۹۹۶)، روش RFLP (Langefors و همکاران، ۱۹۹۸)، SSCP (Mccairns و همکاران، ۲۰۱۱؛ Karaiskou و همکاران، ۲۰۱۰) و DGGE (Gómez و همکاران، ۲۰۱۰؛ Miller و Withler، ۱۹۹۶۹) می‌باشدکه این تحقیقات نشان می‌دهد که ژن‌هایMHC دارای چندشکلی بالایی است و در ارزیابی وضعیت حفاظتی و ایمنی شناختی گونه‌ها بسیار با اهمیت می‌باشند.

تنوع بالای ژنوم MHC در جمعیت‌ها، قابلیت سیستم ایمنی در پاسخ به پاتوژن‌ها را افزایش می‌دهد، از این‌رو فشارهای بهگزینی چون برتری افراد هتروزیگوت (Heterozygosity advantage) و برتری الل‌های نادر (Rare Allele advantage) باعث اعمال فشار متعادل کننده (Balancing Selection می‌شود (Bernatchez و Landry، ۲۰۰۳). این به‌گزینی‌ها و سایر عوامل چون رفتار تولیدمثلی جفت‌گیری با افراد غیرخویشاوند (Disassortative Mating) و رابطه مادر با جنین باعث افزایش چندشکلی و بقای

اللی این ژنوم در طول تکامل جمعیت‌ها می‌شود (Sommer، ۲۰۰۵). در تنگنا قرار گرفتن جمعیت‌ها و اجرای برنامه‌های حفاظتی مانند بازسازی ذخایر می‌توانند ترکیب‌اللی و نسبت‌های ژنوتیپی ژن‌های عملکردی مهمی چون MHC را تغییر دهند و کیفیت ژنتیکی نسل‌های بعدی کاهش یابد (Neff و Pitcher، ۲۰۰۵؛ Hedrick و همکاران، ۱۹۹۹). با توجه به کاهش شدید ذخایر ماهی آزاد دریای خزر و اجرا شدن برنامه بازسازی ذخایر این گونه در ایران، در این تحقیق ترکیب اللی ژنوم MHC مولدین ماهی آزاد بازگشتی به رودخانه‌های حاشیه جنوبی دریای خزر مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور چندشکلی دومین اگزون (جایگاه DAA) ژن MHC کلاس IIα با استفاده از روش SSCP مورد آنالیز قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: در این مطالعه از مولدین وحشی ماهی آزاد دریای خزر (*S. trutta caspius*) صید شده از رودخانه‌های منتهی به دریای خزر که به‌منظور بازسازی ذخایر آن‌ها در مرکز بازسازی ذخایر شهید باهنر کلاردشت مورد تکثیر مصنوعی واقع می‌شوند، تعداد ۵۰ نمونه بافت باله جمع‌آوری و پس از تثبیت در اتانول ۹۶٪ تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

برای استخراج DNA بافت باله ماهیان از کیت Cinnapure (Cinnapure, PR881613) استفاده و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی شد. کمیت DNA به‌دست آمده با استفاده از دستگاه Nanodrop و بررسی جذب ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر و نسبت این دو آنالیز گردید و نمونه‌های با کیفیت برای آنالیز ژنتیکی انتخاب شدند. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل یک واحد آنزیم Taq پلیمراز، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ، بافر 1X، ۵۰ نانوگرم DNA ۰/۵ میکرومولار هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت زیر اضافه و واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (BIOER(XP cycler انجام گرفت(Dionne و همکاران، ۲۰۰۹):

(5´-GTGTTTTATTGGGTTTCTTTTCTC-3´)
(5´-CTCTAAATTACTTCTCTCTCTTAC-3´)

شرایط دمایی بهینه انجام واکنش PCR شامل ۱۰دقیقه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۶۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و بسط نهایی در دمای ۷۲درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. برای بررسی اندازه و کیفیت محصول به‌دست آمده مقدار ۵ میکرولیتر محصول PCRبرروی ژل‌آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد.

برای آنالیز چندشکلی تک‌رشته‌ای (Single Strand Conformation Polymorphism) محصول PCR از روش Sunnucks و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد. برای واسرشته کردن DNA مقدار ۱۰ میکرولیتر محصول PCR به ۱۰ میکرولیتر بافر لودینگ اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این مدت نمونه‌ها به سرعت به سطح یخ انتقال داده شدند و پس از ۵ دقیقه بلافاصله نمونه‌ها درون ژل پلی اکریل آمید (n:10%; c, 37.5:1; TBE 0.5X; Glycerol, 5%) مجهز به سیستم گردش آب خنک (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) اضافه شد. پس از انجام الکتروفورز اولیه با ولتاژ ۴۰۰ ولت به‌مدت ۱۰ دقیقه، الکتروفورز اصلی با ولتاژ ۲۰۰ ولت (۱۰ ولت به ازای هر سانتی‌متر ژل) به‌مدت ۱۸ ساعت با استفاده از دستگاه Biostep (Maxi Gel TV400) انجام گرفت. ژل‌های به‌دست آمده با استفاده از نیترات نقره به‌روش Bassam و همکاران (۱۹۹۳) رنگ‌آمیزی شدند. الگوهای به‌دست‌آمده در ژل‌ها توسط نرم‌افزار Gel Scanner 6.0 بررسی و کدگزاری شدند.

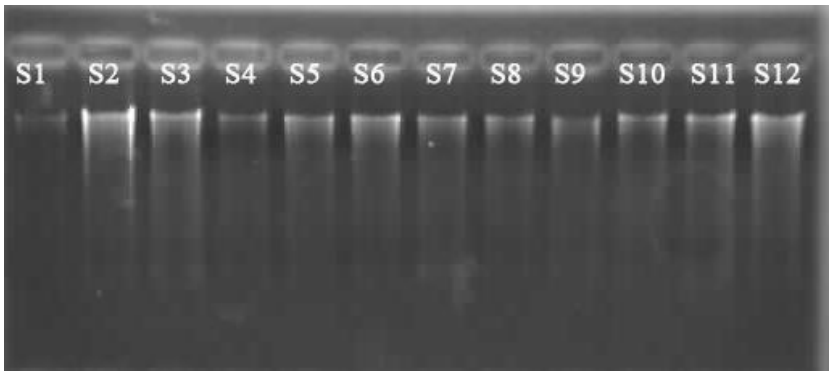
پس از تعیین ژنوتیپ‌ها، آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx 6.41 (Peakall و Smouse، ۲۰۰۶) انجام شد و پارامترهای تنوع اللی، هتروزایگوسیتی مشاهده شده (H_o)، هتروزایگوسیتی مورد انتظار (H_e)، تطابق با تعادل هاردی واینبرگ و شاخص شانون مورد پردازش قرار گرفتند.

نتایج

پس از استخراج DNA نمونه‌های واجد کیفیت مناسب (شکل ۱) برای انجام واکنش PCR انتخاب شدند. نتایج مربوط به تکثیر جایگاه DAA (شکل ۲) اندازه این اگزون را حدود ۳۰۰ جفت باز نشان می‌دهد که بدون باند غیراختصاصی واکنش PCR انجام پذیرفت و برای آنالیز SSCP مورد استفاده قرار گرفتند.

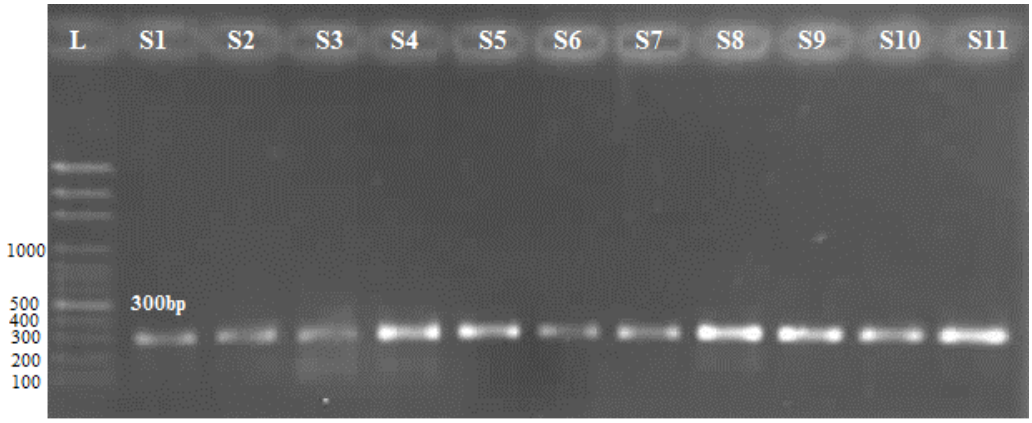
آنالیز چندشکلی دومین اگزون ژن MHC کلاس II ماهی آزاد دریای خزر به‌روش SSCP نشان داد که افراد هتروزیگوت

دارای ۴ باند و افراد هموزیگوت دارای ۲ باند می‌باشند و بالغ بر ۱۰ الگوی SSCP مختلف مشاهده شد (شکل ۳). این جایگاه دارای چندشکلی بالایی بوده به‌طوری‌که پس از آنالیز تعیین ژنوتیپ، در مجموع ۱۵ الل شناسایی شد (جدول ۱) و براساس روش Klein و همکاران (۱۹۹۰) نام‌گذاری شدند.



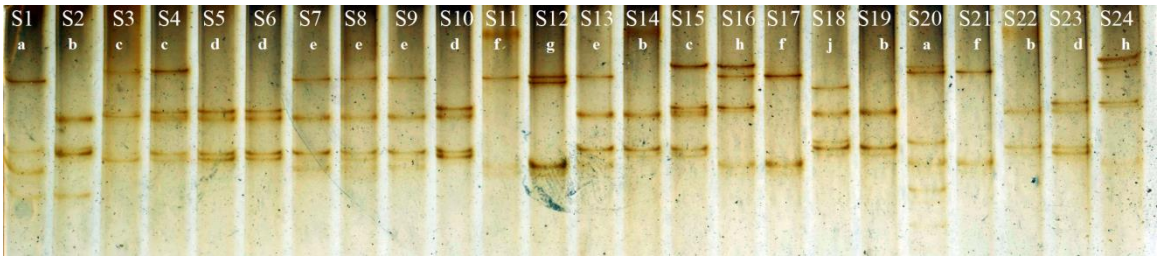
شکل۱: نمونه DNA استخراج شده از بافت باله ماهی آزاد دریای خزر (*S. trutta caspius*)

S1-S12: نمونه ماهیان مختلف، ژل آگارز ۰/۸ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید



شکل۲: محصول PCR جایگاه DAA ژن MHC کلاس IIα ماهی آزاد دریای خزر (*S. trutta caspius*)

L: مارکر وزن مولکولی، S1-S11: نمونه ماهیان مختلف. ژل آگارز ۱/۵ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید



شکل۳: آنالیز SSCPجایگاه DAA ژن MHC کلاس IIα ماهی آزاد دریای خزر (*S. trutta caspius*)

S1-S24: نمونه‌های ماهیان مختلف، a-h: الگوهای SSCP مشاهده شده. ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد حاوی ۵ درصد گلیسرول رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره

فراوانی این الل‌ها در جدول ۱ نشان می‌دهد که الل‌های DAA*03 و DAA*10 دارای بیش‌ترین فراوانی می‌باشند و تعداد زیادی الل با فراوانی پایین‌تر مشاهده می‌شود. آنالیز چندشکلی این ژنوم نشان می‌دهد تعداد الل‌های موثر (N_e) برابر ۵/۳۱ الل می‌باشد، چرا که بیش‌تر الل‌های جایگاه DAA به عنوان الل‌های نادر با فراوانی کم می‌باشند (جدول ۲).

هتروزایگوسیتی مشاهده شده (H_o) و مورد انتظار (H_e) که یکی از شاخص‌های مهم در ارزیابی صلاحیت سیستم ایمنی می‌باشد، به‌ترتیب برابر ۰/۸۰ و ۰/۸۱ می‌باشد (جدول ۲). آنالیز شاخص شانون نشان می‌دهد که ضریب I برابر ۲/۰۳۷ بوده که حاکی از بالا بودن تنوع درون جمعیتی این گونه دارد (جدول ۲). با توجه به بالا بودن هتروزایگوسیتی مشاهده شده این ژنوم، هیچ‌گونه انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ مشاهده نمی‌شود ($p<0/05$).

جدول۱: فراوانی الل‌های شناسایی شده ژن MHC کلاس IIα ماهی آزاد دریای خزر (*S. trutta caspius*)

نام الل‌ها	MHCSaCa-DAA*01	MHCSaCa-DAA*02	MHCSaCa-DAA*03	MHCSaCa-DAA*04	MHCSaCa-DAA*05	MHCSaCa-DAA*06	MHCSaCa-DAA*07	MHCSaCa-DAA*08
فراوانی	۰/۰۱۷	۰/۰۸۳	۰/۲۰۰	۰/۰۱۷	۰/۰۱۷	۰/۰۱۷	۰/۱۰۰	۰/۰۶۷
نام الل‌ها	MHCSaCa-DAA*09	MHCSaCa-DAA*10	MHCSaCa-DAA*11	MHCSaCa-DAA*12	MHCSaCa-DAA*13	MHCSaCa-DAA*14	MHCSaCa-DAA*15	
فراوانی	۰/۰۳۳	۰/۳۵۰	۰/۰۳۳	۰/۰۱۷	۰/۰۱۷	۰/۰۱۷	۰/۰۱۷	

جدول ۲: آنالیز چندشکلی ژن MHC کلاس IIα ماهی آزاد دریای خزر (*S. trutta caspius*)

جایگاه	N	Na	Ne	I	Ho	He	UHe
DAA	۵۰	۱۵/۰۰۰	۵/۳۱۰	۲/۰۸۰	۰/۸۰۰	۰/۸۱۲	۰/۸۲۵

N: تعداد نمونه‌ها؛ Na: تعداد الل‌ها؛ Ne: تعداد موثر الل‌ها؛ I: شاخص اطلاعات شانون؛ Ho: هتروزایگوسیتی مشاهده شده؛ He: هتروزایگوسیتی مورد انتظار؛ UHe: هتروزایگوسیتی مورد انتظار اصلاح شده

بحث

مجموعه مولکول‌های MHC یکی از مهم‌ترین بخش‌های سیستم ایمنی اکتسابی است که تنوع بالای ژنوم کدکننده این مجموعه در حفظ پویایی جمعیت‌ها نقش مهمی دارند (Klein، ۱۹۸۶). علی‌رغم روش‌های مختلف برای تعیین ژنوتیپ این ژنوم، از آن‌جا که روش SSCP، سریع‌ترین و ارزان‌ترین روش تعیین ژنوتیپ می‌باشد (Sunnucks و همکاران، ۲۰۰۱) و از نظر طول قطعه (۳۰۰ جفت باز) محدودیتی در استفاده از این روش وجود نداشت و هم‌چنین با توجه تکرارپذیری مناسب مشاهده الگوهای مختلف (شکل ۳)، این روش در ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های آبزیان با استفاده از نشانگر MHC مناسب می‌باشد. از سوی دیگر، جایگاه DAA که بخش اتصال آنتی‌ژنی مولکول‌های MHC را می‌سازد، در ماهی آزاد دریای خزر دارای یک جایگاه ژنومیک کلاسیک می‌باشد که با نتایج به‌دست آمده در سایر گونه‌های *Salmo trutta* و *Salmo salar* تطابق دارد (Gómez و همکاران، ۲۰۱۰). نتایج حاصل از مشاهده چندشکلی بالای این ژنوم در مطالعه حاضر، مشابه نتایج Gomez و همکاران (۲۰۱۰)؛ Langeforce و همکاران (۱۹۹۸) و سایرین بود و بالغ بر ۱۵ الل مختلف شناسایی شد. این نشانگر در مقایسه با نشانگرهای میکروستلایتی مورد استفاده Shirangi و همکاران (۲۰۱۱)؛ Vera و همکاران (۲۰۱۰) هم چندشکلی بیش‌تری نشان می‌دهد که با نتایج Beacham و همکاران (۲۰۰۴)؛ Landry و Bernatchez (۲۰۰۱) تطابق دارد.

با توجه به فشار به‌گزینی متعادل کننده اعمال شده بر ژنوم MHC، الگوی توزیع فراوانی الل‌های این ژنوم به شکلی است که بیش‌تر الل‌ها دارای فراوانی حد واسط بوده و در طول زمان به‌صورت محافظت شده باقی می‌مانند (Bernatchez و Landry، ۲۰۰۳؛ Hughes، ۱۹۹۱). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد در ماهی آزاد دریای خزر اگرچه فشار متعادل کننده در بالا بردن هتروزایگوسیتی نقش مهمی داشته است، ولی توزیع فراوانی اللی با این به‌گزینی اعمال شده انحراف دارد، به‌طوری‌که تعداد محدودی از الل‌ها دارای فراوانی زیاد (الل‌های DAA*03 و DAA*10) و بسیاری از الل‌های ژنوم MHC دارای فراوانی پایینی هستند (جدول ۱) . فراوانی پایین آلل‌های مذکور می‌تواند در نتیجه شرایط نامناسب زیست‌محیطی و به‌هم خوردن نسبت‌های ژنوتیپی در اثر بازسازی ذخایر مبتنی بر اصول آماری (Demographic) رخ داده باشد (Hughes، ۱۹۹۱؛ Maruyama و Nei، ۱۹۸۱) و زنگ خطری به‌منزله رانش ژنتیکی آن‌ها در طی فرایند بازسازی ذخایر این ماهی تلقی گردد که لازم است مورد توجه جدی مدیران مسئول در امر بازسازی ذخائر قرار گیرد. باتوجه به اهمیت این الل‌ها در ثبات و پایداری جمعیت‌ها

(Ujvari و Belov، ۲۰۱۱) و وابستگی شدید ذخایر این گونه به فرایند سالانه بازسازی، مدیریت ژنتیکی بازسازی ذخایر، نقش حیاتی در حفظ الل‌های ژنوم این ماهی و هم‌چنین بهبود شاخص‌های شایستگی زیستی این گونه (مثل مقاومت به بیماری‌ها (Miller و همکاران، ۲۰۰۴) و موفقیت تولیدمثل (Sommer، ۲۰۰۵)) در آینده و در نتیجه بقا و پایداری آن در اکوسیستم دریای خزر خواهد داشت.

بنابراین از آن‌جایی‌که پس از فرایند تکثیر مصنوعی سالانه تعداد زیادی لارو ماهی آزاد به دریای خزر رهاسازی می‌گردد و در نهایت تعداد محدودی مولد برای تخم‌ریزی مجدداً به رودخانه‌ها مهاجرت می‌نمایند (Kheyrandish و همکاران، ۲۰۱۰)، لذا چنان‌چه در مولدین ماهی آزاد دریای خزر، فراوانی الل‌های ژنوم MHC موردبررسی در این تحقیق، مناسب تشخیص داده شود می‌تواند به‌عنوان شاخصی در مدیریت بازسازی و حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای مصطفی رضوانی ریاست مرکز بازسازی ذخایر شهید باهنر کلاردشت برای همکاری برای در اختیار قرار دادن نمونه‌ها تشکر می‌گردد.

منابع

1. **Allendorf, F.W. and Luikart, G., 2007.** Conservation and the genetics of populations, Mammalia. Blackwell, Malden, MA. 642 p.
2. **Bassam, B.J. and Caetano-Anollés, G., 1993.** Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Appl Biochem Biotechnol Enzym Eng Biotechnol. Vol. 42, No. 2, pp: 181-188.
3. **Beacham, T.D.; Lapointe, M.; Candy, J.R.; McIntosh, B.; MacConnachie, C.; Tabata, A. and Withler, R.E., 2004.** Stock identification of Fraser River sockeye salmon using microsatellites and major histocompatibility complex variation. Trans Am Fish Soc. Vol. 133, No. 5, pp: 1117-1137.
4. **Bernatchez, L., 2001.** The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. Evolution. Vol. 55, No. 2, pp: 351–379.
5. **Bernatchez, L. and Landry, C., 2003.** MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? J Evol Biol. Vol. 16, No.3, pp: 363-377.
6. **Consuegra, S.; Megens, H.J.; Schaschl, H.; Leon, K.; Stet, R. and Jordan, W.C., 2005**. Rapid evolution of the MHC class I locus results in different allelic compositions in recently diverged populations of Atlantic salmon. Mol Biol Evol. Vol. 22, No. 4, pp: 1095–1106.
7. **Dionne, M.; Miller, K.M.; Dodson, J.J. and Bernatchez, L., 2009.** MHC standing genetic variation and pathogen resistance in wild Atlantic salmon. Phil Trans Biol Sci. Vol. 364, No. 1523, pp: 1555-1565.
8. **Frankham, R.; Ballou, J.D. and Briscoe, D.A., 2002.** Introduction to Conservation Genetics, Cambridge University Press. Cambridge, UK. 617 p.
9. **Gómez, D.; Conejeros, P. and Marshall, S.H., 2010.** MHC evolution in three salmonid species: a comparison between class II alpha and beta genes. Immunogenetics. Vol. 62, No. 8, pp: 531-542.
10. **Hedrick, P.W., 1994.** Evolutionary genetics of the major histocompatibilitycomplex. Am Nat. Vol. 143, pp: 945–964.
11. **Hedrick, P.W.; Parker, K.M.; Miller, E.L. and Miller, P.S., 1999.** Major Histocompatibility Complex Variation in the Endangered Przewalski's Horse. Genetics. Vol. 152, No. 4, pp: 1701-1710.
12. **Hughes, A.L., 1991.** MHC polymorphism and the design of captive breeding programs. Conservation Biology. Vol. 5, No. 2, pp: 249-251.
13. **IranFisheries**. **2010**. Annualy statistical report in Iran Fisheries Organization. Available at: www.Iranfisheries.com.
14. **IUCN**. **2012**. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. http://www.iucnredlist.org.
15. **Karaiskou, N.; Moran, P.; Georgitsakis, G.; Abatzopoulos, T.J. and Triantafyllidis, A., 2010.** High allelic variation of MHC class II alpha antigen and the role of selection in wild and cultured *Sparus aurata* populations. Hydrobiologia. Vol. 638, No. 1, pp: 11-20.
16. **Kheyrandish, A.; Abdoli, A.; Mostafavi, H.; Niksirat, H.; Naderi, M. and Vatandoost, S., 2010.** Age and growth of brown trout (*Salmo trutta*) in six rivers of the Southern part of Caspian basin. Am J Anim Vet Sci. Vol. 5, pp: 8–12.

7140-7140.

28. **Peakall, R. and Smouse, P.E., 2006.** GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol Ecol. Vol. 6, No. 1, pp: 288-295.
29. **Rammensee, H.G., 1995**. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. Curr Opin Immunol. Vol. 7, No. 1, pp: 85-96.
30. **Shirangi, S.A.; Kalbassi, M.R. and Dorafshan, S., 2011.** Microsatellite Polymorphism Reveals Low Genetic Differentiation between fall and Spring Migratory Forms of Endangered Caspian Trout, *salmotruttacaspius*. Caspian Journal of Environmental Sciences. Vol. 9, pp: 9-16.
31. **Shum, B.; Guethlein, L.; Flodin, L.; Adkison, M.; Hedrick, R.; Nehring, R.; Stet, R.; Secombes, C. and Parham, P., 2001.** Modes of salmonid MHC Class I and II evolution differ from the primate paradigm 1. J Immunol. Vol. 166, No. 5, pp: 3297–3308.
32. **Sommer, S., 2005.** The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. Front Zool. Vol. 2, No. 1, pp: 16.
33. **Sunnucks, P.A.C.C.; Wilson, A.C.C.; Beheregaray, L.B.; Zenger, K.; French, J. and Taylor, A., C. 2001.** SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. Mol Ecol. Vol. 9, No. 11, pp: 1699-1710.
34. **Ujvari, B. and Belov, K., 2011.** Major histocompatibility complex (MHC) markers in conservation biology. Int J Mol Sci. Vol. 12, No. 8, pp: 5168-5186.
35. **Vera, M.; Sourinejad, I.; Bouza, C.; Vilas, R.; Pino-Querido, A.; Kalbassi, M.R. and Martínez, P., 2011.** Phylogeography, genetic structure, and conservation of the endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877), from Iran. Hydrobiologia. Vol. 664, No. 1, pp: 51-67.
17. **Kiabi, B.H.; Abdoli, A. and Naderi, M., 1999.** Status of the fish fauna in the South Caspian Basin of Iran. Zool Middle East. Vol. 18, No. 1, pp: 7140-7140.
18. **Klein, J.; Bontrop, R.E.; Dawkins, R.L.; Erlich, H.A.; Gyllensten, 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. Vol. 31, pp: 217–219.
19. **Klein, J., 1986.** Natural History of the Major Histocompatibility Complex. New York, Wiley. 775 p.
20. **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*). Mol Ecol. Vol. 10, No. 10, pp: 2525–2539.
21. **Langefors, A.; Von Schantz, T. and Widegren, B. 1998.** Allelic variation of MHC class II in Atlantic salmon; a population genetic analysis. Heredity. Vol. 80, No. 5, pp: 568–575.
22. **Maruyama, T. and Nei, M., 1981**. Genetic variability maintained by mutation and overdominant selection in finite populations. Genetics. Vol. 98, No. 2, pp: 441-459.
23. **Mccairns, R.S.; Bourget, S. and Bernatchez, L., 2011.** Putative causes and consequences of MHC variation within and between locally adapted stickleback demes. Mol Ecol. Vol. 20, No. 3, pp: 486-502.
24. **Miller, K.M.; Winton, J.R.; Schulze, A.D.; Purcell, M.K. and Ming, T.J., 2004.** Major histocompatibility complex loci are associated with susceptibility of Atlantic salmon to infectious hematopoietic necrosis virus. Environ Biol Fish. vol. 69, No. 1-4, pp: 307-316.
25. **Miller, K.M. and Withler, R.E., 1996.** The salmonid class I MHC: limited diversity in a primitive teleost. Immunological reviews. Vol. 166, No. 1, pp: 279-293.
26. **Neff, B.D. and Pitcher, T.E., 2005.** Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. Mol Ecol. Vol. 14, No. 1, pp: 19-38.
27. **Niksirat, H. and Abdoli, A., 2009**. On the status of the critically endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*, during recent decades in the southern Caspian Sea basin. Zool Middle East. Vol. 46, No. 1, pp: