

ارزیابی ژن MHC-class II α در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) به روش SSCP

- **کاوه خسرویانی:** گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، صندوق پستی: 356-46414
- **محمدرضا کلباسی*:** گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، صندوق پستی: 356-46414
- **مجید صادقی زاده:** گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، صندوق پستی: 14115-175

تاریخ پذیرش: شهریور 1392

تاریخ دریافت: اسفند 1391

چکیده

مولکول‌های MHC در مهره‌داران نقش مهمی در عملکرد سیستم 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 MHC گونه بومی و در معرض انقراض ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) که مورد حمایت برنامه‌های بازسازی ذخایر می‌باشد، مورد بررسی قرار گرفت. از این رو تنوع جایگاه DAA ژن MHC کلاس II α در 50 نمونه ماهی آزاد دریای خزر با استفاده از روش SSCP بررسی شد. نتایج تحقیق نشان می‌دهد که این ژن حداقل واجد 15 آلل می‌باشد که آلل‌های MHCScCa-DAA*03 و MHCScCa-DAA*10 دارای بیشترین فراوانی می‌باشند. همچنین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (HO)، مورد انتظار (He) و شاخص شانون به ترتیب برابر 0/80، 0/82 و 2/037 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 آلل‌هایی که فراوانی پایین دارند در خطر از دست رفتن می‌باشند. از این رو 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

صید بی‌رویه، آلودگی دریای خزر و عدم امکان تکثیر رودخانه‌ایی، این گونه دارای اهمیت اقتصادی و زیست-محیطی بالایی است (Niksirat و Abdoli، 2009؛ Kiabi و همکاران، 1999) و برای بازسازی ذخایر این ماهی سالانه بالغ بر 500 هزار قطعه بچه‌ماهی به دریا رهاسازی می‌شود (Iran Fisheries، 2010). با توجه به کاهش شدید تکثیر طبیعی و مشکلات اشاره شده، ذخایر این گونه به شدت 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، 2012؛ Kiabi و همکاران، 1999). از آنجایی که 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 10-15 گرمی به دریا، ممکن است انواع به‌گزینی تصادفی و عمدی

مقدمه

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmotrutta caspius*) تنها گونه از خانواده آزاد ماهیان (Salmonidae) دریای خزر می‌باشد، که از شاخه دانوبی قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta*) منشأ گرفته است (Bernatchez، 2001). 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، 2010). با توجه به خوش-خوراکی و بازارپسندی بالا و همچنین کاهش ذخایر در اثر



فشارهای به‌گزینی چون برتری افراد هتروزیگوت (Heterozygosity advantage) و برتری الل‌های نادر (Rare Allele advantage) باعث اعمال فشار متعادل‌کننده (Balancing Selection) می‌شود (Landry و Bernatchez، 2003). 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، 2005). در تنگنا قرار گرفتن جمعیت‌ها و اجرای برنامه‌های حفاظتی مانند بازسازی ذخایر می‌توانند ترکیب اللی و نسبت‌های ژنوتیپی ژن‌های عملکردی مهمی چون MHC را تغییر دهند و کیفیت ژنتیکی نسل‌های بعدی کاهش یابد (Pitcher و Neff، 2005؛ Hedrick و همکاران، 1999). 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 II α 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 50 نمونه بافت باله جمع‌آوری و پس از تثبیت در اتانول 96% تا زمان انجام آزمایشات در فریزر 20- 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 0/8 درصد بررسی شد. کمیت DNA به‌دست آمده با استفاده از دستگاه Nanodrop و بررسی جذب 280/260 نانومتر و نسبت این دو آنالیز گردید و نمونه‌های با کیفیت برای آنالیز ژنتیکی انتخاب شدند. واکنش PCR در حجم نهایی 20 میکرولیتر شامل یک واحد آنزیم Taq پلیمرز، 1/5 میلی‌مولار MgCl₂، 0/2 میلی‌مولار dNTP، بافر 1X، 50 نانوگرم DNA 0/5 میکرومولار هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت زیر اضافه و واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر BIOER (XP cycler) انجام گرفت (Dionne و همکاران، 2009):

(5'-GTGTTTTATTGGGTTTCTTTTCTC-3')
(5'-CTCTAAATTACTTCTCTCTTAC-3')

شرایط دمایی بهینه انجام واکنش PCR شامل 10 دقیقه واسرشته‌سازی در دمای 94 درجه سانتی‌گراد، 35 چرخه واسرشته‌سازی در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 30 ثانیه، اتصال پرایمر در دمای 64 درجه سانتی‌گراد

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 زیست-محیطی را افزایش می‌دهد (Frankham و همکاران، 2002). استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA در ارزیابی و پایش تغییرات ژنتیکی جمعیت‌های جانوری کاربردهای وسیعی دارند به‌طوری‌که نشانگرهای خنثی چون میکروساتلایت (Microsatellite) و چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) در بیش‌تر مطالعات مورد استفاده قرار می‌گیرد (Luikart و Allendorf، 2007). با توجه به این‌که این نشانگرها با شرایط محیطی ارتباط مستقیم ندارند، نمی‌توانند به خوبی گویای اثرات ناشی از فشار به‌گزینی محیطی باشند، از این‌رو امروزه از ژن‌های عملکردی که مرتبط با شایستگی زیستی گونه‌ها باشند، استفاده می‌شود (Landry و Bernatchez، 2003). یکی از ژن‌های قابل بررسی مهم، مجموعه ژن MHC (Major Histocompatibility Complex) می‌باشد که ارتباطات مستقیم و غیرمستقیم متعددی با شایستگی زیستی در مهره‌داران دارد (Ujvari و Belov، 2011؛ Landry و Bernatchez، 2003).

در واقع ژن‌های MHC مرتبط با سیستم ایمنی اکتسابی و یکی از متنوع‌ترین ژنوم‌کننده پروتئین در میان مهره‌داران هستند و یکی از مناسب‌ترین ژن‌های کاندید برای بررسی سازگاری تکاملی جانوران می‌باشند (Hedrick، 1994). ژن‌های MHC دو دسته اصلی گلیکوپروتئین‌های سطح سلولی کلاس I و II را کد می‌کنند که مسئول تحویل دادن پپتیدهای خودی و غیرخودی به لئوسیت‌های T می‌باشند. مولکول‌های MHC کلاس I پپتیدهای داخل سلولی را به سلول‌های T کشته نوع CD8⁺، ولی MHC کلاس II پپتیدهای خارج سلولی را به لئوسیت‌های T کمکی نوع CD4⁺ تحویل می‌دهند (Rammensee، 1995). 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، 2005؛ Shum و همکاران، 2001). ژن‌های MHC در آزادماهیان با استفاده از روش‌های مختلفی آنالیز شده است که از آن-جمله، تعیین توالی نوکلئوتیدی (Miller و Withler، 1996)، روش RFLP (Lanfords و همکاران، 1998)، SSCP (Mccairns و همکاران، 2011؛ Karaiskou و همکاران، 2010) و DGGE (Gómez و همکاران، 2010؛ Miller و Withler، 1996) می‌باشد که این تحقیقات نشان می‌دهد که ژن‌های MHC 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



پس از تعیین ژنوتیپ‌ها، آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenAIEx 6.41 (Peakall و Smouse، 2006) 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.

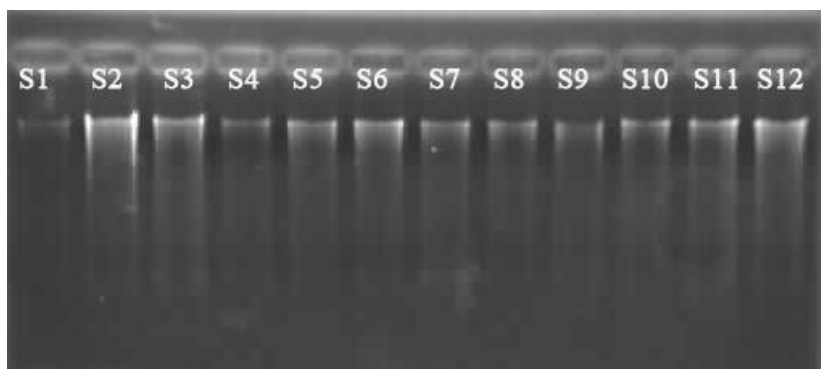
نتایج

پس از استخراج DNA نمونه‌های واجد کیفیت مناسب (شکل 1) برای انجام واکنش PCR انتخاب شدند. نتایج مربوط به تکثیر جایگاه DAA (شکل 2) اندازه این آگزون را حدود 300 جفت باز نشان می‌دهد که بدون باند غیراختصاصی واکنش PCR انجام پذیرفت و برای آنالیز SSCP مورد استفاده قرار گرفتند.

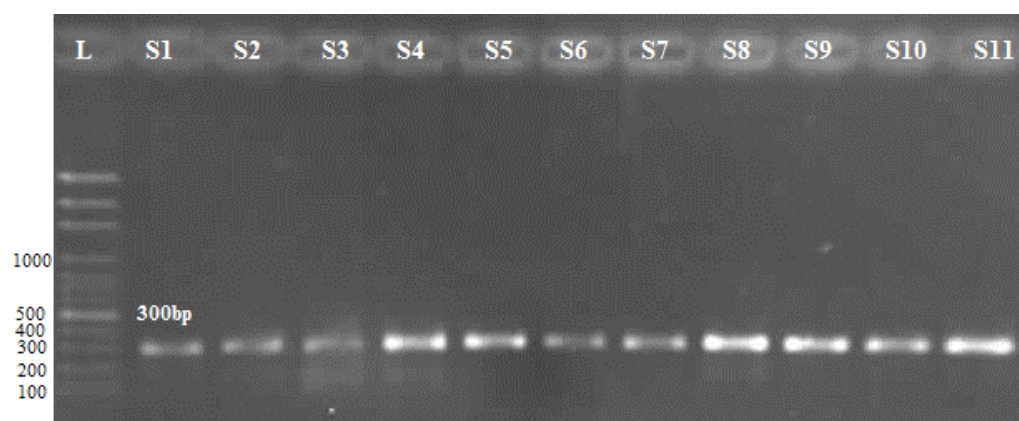
آنالیز چندشکلی دومین آگزون ژن MHC کلاس II ماهی آزاد دریای خزر به روش SSCP نشان داد که افراد هتروزایگوت دارای 4 باند و افراد هموزیگوت دارای 2 باند می‌باشند و بالغ بر 10 الگوی SSCP مختلف مشاهده شد (شکل 3). این جایگاه دارای چندشکلی بالایی بوده به طوری که پس از آنالیز تعیین ژنوتیپ، در مجموع 15 الل شناسایی شد (جدول 1) و براساس روش Klein و همکاران (1990) نام‌گذاری شدند.

به مدت 30 ثانیه، بسط در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه و بسط نهایی در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه انجام گرفت. برای بررسی اندازه و کیفیت محصول به دست آمده مقدار 5 میکرولیتر محصول PCR بر روی ژل آگارز 1/5 درصد بررسی شد.

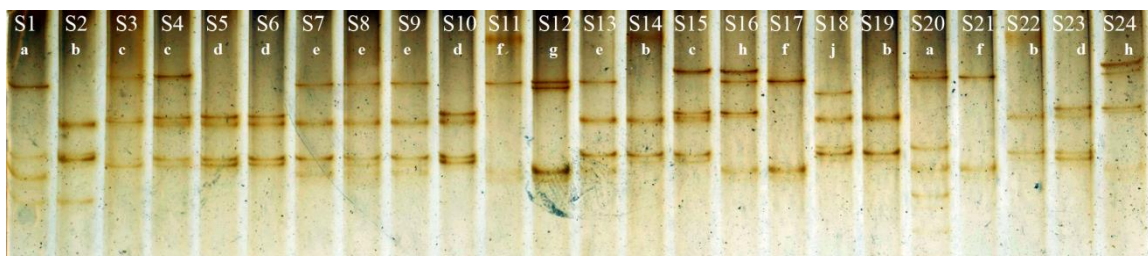
برای آنالیز چندشکلی تک‌رشته‌ای (Single Strand Conformation Polymorphism) محصول PCR از روش Sunnucks و همکاران (2000) استفاده شد. برای واسرشته کردن DNA مقدار 10 میکرولیتر محصول PCR به 10 میکرولیتر بافر لودینگ اضافه و به مدت 10 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این مدت نمونه‌ها به سرعت به سطح یخ انتقال داده شدند و پس از 5 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 4 درجه سانتی‌گراد) اضافه شد. پس از انجام الکتروفورز اولیه با ولتاژ 400 ولت به مدت 10 دقیقه، الکتروفورز اصلی با ولتاژ 200 ولت (10 ولت به ازای هر سانتی‌متر ژل) به مدت 18 ساعت با استفاده از دستگاه Biostep (Maxi Gel TV400) انجام گرفت. ژل‌های به دست آمده با استفاده از نیترات نقره به روش Bassam و همکاران (1993) رنگ‌آمیزی شدند. الگوهای به دست آمده در ژل‌ها توسط نرم‌افزار Gel Scanner بررسی و کدگذاری شدند.



شکل 1: نمونه DNA استخراج شده از بافت باله ماهی آزاد دریای خزر (*S. trutta caspius*) S1-S12: نمونه ماهیان مختلف، ژل آگارز 0/8 درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید



شکل 2: محصول PCR جایگاه DAA ژن MHC کلاس II α ماهی آزاد دریای خزر (*S. trutta caspius*)
L: مارکر وزن مولکولی، S1-S11: نمونه ماهیان مختلف. ژل آگارز 1/5 درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید



شکل 3: آنالیز SSCP جایگاه DAA ژن MHC کلاس II α ماهی آزاد دریای خزر (*S. trutta caspius*)
S1-S24: نمونه‌های ماهیان مختلف، a-h: الگوهای SSCP مشاهده شده. ژل پلی اکریل آمید 10 درصد حاوی 5 درصد گلیسرول رنگ آمیزی شده با نیترات نقره

سیستم ایمنی می‌باشد، به ترتیب برابر 0/80 و 0/81 می‌باشد (جدول 2). آنالیز شاخص شانون نشان می‌دهد که ضریب I برابر 2/037 بوده که حاکی از بالا بودن تنوع درون جمعیتی این گونه دارد (جدول 2). با توجه به بالا بودن هتروزیگوسیتی مشاهده شده این ژنوم، هیچ‌گونه انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ مشاهده نمی‌شود ($p < 0/05$).

فراوانی این ال‌ها در جدول 1 نشان می‌دهد که ال‌های DAA*03 و DAA*10 دارای بیشترین فراوانی می‌باشند و تعداد زیادی ال با فراوانی پایین‌تر مشاهده می‌شود. آنالیز چندشکلی این ژنوم نشان می‌دهد تعداد ال‌های موثر (N_e) برابر 5/31 ال می‌باشد، چرا که بیش‌تر ال‌های جایگاه DAA به عنوان ال‌های نادر با فراوانی کم می‌باشند (جدول 2). هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و مورد انتظار (H_e) که یکی از شاخص‌های مهم در ارزیابی صلاحیت

جدول 1: فراوانی ال‌های شناسایی شده ژن MHC کلاس II α ماهی آزاد دریای خزر (*S. trutta caspius*)

نام ال‌ها	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	0/017	0/083	0/200	0/017	0/017	0/017	0/100	0/067
نام ال‌ها	MHCSaCa-DAA*09	MHCSaCa-DAA*10	MHCSaCa-DAA*11	MHCSaCa-DAA*12	MHCSaCa-DAA*13	MHCSaCa-DAA*14	MHCSaCa-DAA*15	
فراوانی	0/033	0/350	0/033	0/017	0/017	0/017	0/017	

جدول 2: آنالیز چندشکلی ژن MHC کلاس II α ماهی آزاد دریای خزر (*S. trutta caspius*)

جایگاه	N	Na	Ne	I	Ho	He	UHe
DAA	50	15/000	5/310	2/080	0/800	0/812	0/825

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

بحث

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، 2010). نتایج حاصل از مشاهده چندشکلی بالای این ژنوم در مطالعه حاضر، مشابه نتایج Gomez و همکاران (2010)؛ Langeforce و همکاران (1998) و سایرین بود و بالغ بر 15 ال مختلف شناسایی شد. این نشانگر در مقایسه با نشانگرهای میکروساتلیتی مورد استفاده Shirangi و همکاران (2011)؛ Vera و همکاران (2010) هم چندشکلی بیش‌تری نشان می‌دهد که با نتایج Beacham و همکاران (2004)؛ Landry و Bernatchez (2001) تطابق دارد.

با توجه به فشار به‌گزینی متعادل کننده اعمال شده بر

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، 1986). علی‌رغم روش‌های مختلف برای تعیین ژنوتیپ این ژنوم، از آن‌جا که روش SSCP، سریع‌ترین و ارزان‌ترین روش تعیین ژنوتیپ می‌باشد (Sunnucks و همکاران، 2001) و از نظر طول قطعه (300 جفت باز) محدودیتی در استفاده از این روش وجود نداشت و همچنین با توجه تکرارپذیری مناسب مشاهده الگوهای مختلف (شکل 3)، 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



- 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 histocompatibility complex. *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.** Annual 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>.

ژنوم MHC، الگوی توزیع فراوانی آلل‌های این ژنوم به شکلی است که بیش‌تر آلل‌ها دارای فراوانی حد واسط بوده و در طول زمان به‌صورت محافظت شده باقی می‌مانند (Bernatchez و Landry، 2003؛ Hughes، 1991). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد در ماهی آزاد دریای خزر اگرچه فشار متعادل‌کننده در بالا بردن هتروزیگوسیتی نقش مهمی داشته است، ولی توزیع فراوانی آللی با این به‌گزینی اعمال شده انحراف دارد، به‌طوری‌که تعداد محدودی از آلل‌ها دارای فراوانی زیاد (آلل‌های DAA*03 و DAA*10) و بسیاری از آلل‌های ژنوم MHC دارای فراوانی پایینی هستند (جدول 1). 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، 1991؛ Maruyama و Nei، 1981) 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 ذخایر قرار گیرد. باتوجه به اهمیت این آلل‌ها در ثبات و پایداری جمعیت‌ها (Ujvari و Belov، 2011) و وابستگی شدید ذخایر این گونه به فرایند سالانه بازسازی، مدیریت ژنتیکی بازسازی ذخایر، نقش حیاتی در حفظ آلل‌های ژنوم این ماهی و همچنین بهبود شاخص‌های شایستگی زیستی این گونه (مثل مقاومت به بیماری‌ها (Miller و همکاران، 2004) و موفقیت تولیدمثل (Sommer، 2005)) 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 تخریزی مجدداً به رودخانه‌ها مهاجرت می‌نمایند (Kheyrandish و همکاران، 2010)، لذا چنانچه در مولدین ماهی آزاد دریای خزر، فراوانی آلل‌های ژنوم MHC مورد بررسی 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.;**



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: 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, *salmotruttacaspus*. 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
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.
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.



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.

