

Cloning, Sequencing, and Detection of *MHC-DAB II* Gene Polymorphism in Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Kalbassi M.R.^{*1} PhD,
Jorfi E.² PhD,
Sadeghizadeh M.³ PhD,
Amirinia S.⁴ PhD

How to cite this article

Kalbassi M R, Jorfi E, Sadeghizadeh M, Amirinia S. Cloning, Sequencing, and Detection of *MHC-DAB II* Gene Polymorphism in Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(4):611-619.

¹Fisheries Department, Natural Resources & Marine Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Aquaculture Research Center South of Iran, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education & Extension Organization (AREEO), Ahwaz, Iran

³Genetic Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

⁴Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Fisheries Department, Natural Resources & Marine Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 82883145
Fax: +98 (21) 82884180
kalbassi_m@modares.ac.ir

Article History

Received: November 30, 2016

Accepted: June 5, 2017

ePublished: December 21, 2018

ABSTRACT

Aims Continuous monitoring of aquatic genetic diversity among different populations in fish hatcheries is an essential requirement to maintain the viability and sustainability of aquaculture industry. The aim of this study was cloning, sequencing, and detection of major histocompatibility complex (MHC) *class II β* in silver carp.

Materials & Methods In this experimental study, the polymorphism of *MHC class II β* in 138 species of silver carp was studied in 4 different hatcheries of Iran (Guilan, Mazandaran, Golestan, and Khuzestan provinces) in addition to an imported group from China. By polymerase chain reaction (PCR), *Hymo-DAB* gene amplification was performed and the different haplotypes of the samples were analyzed by single-strand conformation polymorphism (SSCP) method and the sequences obtained with ClustalW2 were matched in Geneious 4.8.5 software and the phylogeny tree of the sequences was plotted.

Findings The PCR reaction of the *MHC-DAB II* genome of the silver carp with a weight of about 350bp without side band was obtained in the samples, indicating the amplification of *t Hymo-DAB1*01/DAB2*1* gene in silver carp. The highest and lowest diversity of haplotypes was observed in populations of Khuzestan and Mazandaran. The mean difference between synonymous site (dS) and nonsynonymous site (dN) of alleles was 0.25 and 0.30, respectively, with the ratio of 1.2. The highest allelic richness was observed in samples imported from China (5) and the lowest allelic richness was among Mazandaran species (3.8).

Conclusion Haplotype diversity in silver carp belongs to *Hymo-DAB1*01/DAB2*1* gene and among different groups of this species, the highest haplotype diversity is in the Khuzestan population and the highest allelic richness is related to samples imported from China.

Keywords Polymorphism; SSCP; MHC class II gene; Silver carp

CITATION LINKS

[1] Applications and implications of neutral ... [2] Principles of field crop ... [3] Correlation between fitness and ... [4] The utility of single nucleotide ... [5] Fighting change with change ... [6] Balancing selection and ... [7] Enhanced immunological surveillance in mice ... [8] The scent of genetic compatibility ... [9] Major histocompatibility genes ... [10] Natural selection acts on Atlantic ... [11] Polymorphism and evolution of the ... [12] Signals of heterogeneous selection ... [13] Major Histocompatibility Complex (MHC) markers ... [14] Can sexual selection theory inform ... [15] Comparative analysis of population ... [16] The importance of immune gene ... [17] Isolation of carp genes encoding major ... [18] New beta chain-encoding Mhc ... [19] Characterization of class II A and B ... [20] Genetic structure of brown ... [21] DNA marker technologies and their ... [22] Single Strand Conformation Polymorphism ... [23] Single Strand Conformation Polymorphism ... [24] Technical note: DNA typing for ... [25] FishStatJ - software for fishery ... [26] Molecular ... [27] MH-DAB gene polymorphism ... [28] Optimization of a reliable, fast, cheap ... [29] Geneious ... [30] MEGA7: Molecular evolutionary ... [31] DnaSP v5: A software for comprehensive ... [32] Nomenclature for the major histocompatibility ... [33] FSTAT, a program to estimate and test ... [34] Mate selection in captive-breeding ... [35] Behavioural and genetic analyses of mate ... [36] MHC-disassortative mating preferences ... [37] Characterization of isogenic carp ... [38] Association between major histocompatibility ... [39] Major histocompatibility complex ... [40] In situ localisation of major ... [41] Coding sequences of the MHC class ... [42] Genetic variation of the major ... [43] Evidence that the separation of Mhc ... [44] MHC class II A genes in the ... [45] Molecular cloning and polymorphism ... [46] Development of MHC class I and II B primers in common carp and its molecular ... [47] Polymorphism of major histocompatibility ... [48] Detection and isolation of nuclear haplotypes ... [49] MHC polymorphism and disease resistance ... [50] Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical ...

کلونینگ، توالی‌یابی و شناسایی چندشکلی‌های جایگاه ژنی *MHC-DAB II* در ماهی فیتوفاگ

محمدرضا کلباسی * PhD

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

الهام جرفی PhD

پژوهشکده آبی‌پروری جنوب کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

مجید صادقی‌زاده PhD

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

سیروس امیری‌نیا PhD

سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، معاونت پژوهشی، تهران، ایران

چکیده

اهداف: ارزیابی و پایش مداوم تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف آبزیان پرورشی در کارگاه‌های تکثیر آبزیان یکی از ضروری‌ترین نیازمندی‌ها برای حفاظت از پویایی و پایداری صنعت آبی‌پروری است. هدف این پژوهش، کلونینگ، توالی‌یابی و شناسایی چندشکلی‌های جایگاه ژنی *MHC-DAB II* در ماهی فیتوفاگ بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی، چندشکلی ژن *MHC class II β* در ۱۳۸ نمونه باله‌ماهی فیتوفاگ پرورشی در چهار کارگاه تکثیر ایران (گیلان، مازندران، گلستان، استان خوزستان) و نمونه‌های لاین وارداتی از چین مطالعه شد. با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ضمن تکثیر قطعه ژنی *Hymo-DAB*، الگوهای هاپلوتایپی مختلف نمونه‌ها با روش SSCP بررسی و توالی‌های به‌دست‌آمده با ClustalW2 در نرم‌افزار Geneious 4.8.5 هم‌ردیف و مرتب شدند و درخت فیلوژنی توالی‌ها رسم شد.

یافته‌ها: محصول واکنش PCR مربوط به جایگاه *DAB* ژنوم *MHC* کلاس II ماهی فیتوفاگ با وزن حدود ۳۵۰ جفت‌باز بدون باند جانبی در نمونه‌های مورد مطالعه به دست آمد که بیانگر تکثیر جایگاه ژنی *Hymo-DAB1*01/DAB2*1* در ماهی فیتوفاگ بود. بیشترین و کمترین تنوع هاپلوتایپی به‌ترتیب در جمعیت‌های خوزستان و مازندران مشاهده شد. میانگین اختلاف جایگاه‌های همسان (dS) و جایگاه‌های غیرهمسان (dN) بین آلل‌ها به‌ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۳۰ و نسبت این دو عامل ۱/۲ بود. بالاترین غنای آللی در نمونه‌های وارداتی از چین (۵) و کمترین غنای آللی میان نمونه‌های مازندران (۳/۸) مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** تنوع هاپلوتایپی حاصله در ماهی فیتوفاگ به ژن *Hymo-DAB1*01/DAB2*1* تعلق دارد و میان گروه‌های مختلف این گونه، بیشترین تنوع هاپلوتایپی در جمعیت خوزستان و بالاترین غنای آللی مربوط به نمونه‌های وارداتی از چین است.

کلیدواژه‌ها: چندشکلی جایگاه ژنی، SSCP، ژن *MHC class II β*، فیتوفاگ

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۱۵

*نویسنده مسئول: kalbassi_m@madares.ac.ir

مقدمه

کسب آگاهی درباره نحوه تاثیر تنوع ژنتیکی بر شایستگی بقا در افراد و جمعیت‌ها همواره مورد توجه ویژه محققان بوده است [1]. تنوع ژنتیکی یکی از نیازهای کلیدی برای سازگاری جمعیت‌ها در برابر تغییرات محیطی است و فقدان این تنوع به‌واسطه پدیده‌هایی همچون جریان ژنی محدود یا پیشامد ژنتیکی می‌تواند بر بقای جمعیت‌ها و حیات گونه‌ها تاثیرگذار باشد [2]. اگر چه در طول دهه‌های گذشته نشانگرهای مولکولی متنوعی از جمله میکروستلایتها، مینی‌ستلایتها و چندشکلی‌های نوکلئوتیدی تکی برای تخمین تنوع ژنتیکی به کار گرفته شده‌اند [3,4]، اما به دلیل

عدم ارتباط آنها با ژن‌های کارکردی قادر به ارایه تخمین دقیق در ارتباط با قدرت سازش و شایستگی بقا میان افراد و جمعیت‌ها نیستند [5]. مجموعه ژن‌های سازگار نسبی (MHC) که مسئولیت کد نمودن پروتئین‌های دخیل در پاسخ‌های ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها را میان مهره‌داران بر عهده دارند [6]، از بهترین سنج‌های ارزیابی تنوع ژنتیکی سازشی در مقایسه با سایر روش‌ها هستند [1]. کارکرد ایمونولوژیک ژن‌های MHC برای اولین بار توسط دوهرتی و زینکرناکل آشکار شده که نمایانگر ارتباط پاسخ سلول‌های T به آنتی‌ژن‌ها و مولکول‌های MHC بوده است و چنین فرض نموده‌اند که افراد هتروزیگوت از نظر این ژن پاسخ‌های قوی‌تری نسبت به افراد هموزیگوت از خود بروز می‌دهند و این موضوع بیانگر اهمیت تنوع در ژن‌های MHC است [7]. شناسایی پاتوژن‌های مهاجم در سیستم ایمنی از طریق دو گروه ژن‌های کلاس یک و دو صورت می‌گیرد که بیشترین چندشکلی را میان مهره‌داران به خود اختصاص داده‌اند [8]. ضمن آن که شواهدی دال بر تاثیر شدیدتر پدیده انتخاب و تنوع بیشتر در آلل‌های کلاس دو نسبت به کلاس یک در ماهیان وجود داشته است [9,10].

جایگاه ژنی MHC، کدکننده آنتی‌ژن‌ها و پروتئین‌های سطحی لنفوسیت‌هایی است که در واکنش دفاعی بدن و شناسایی پروتئین‌های خارجی دخالت دارند و قادر به تشخیص آنتی‌ژن‌های خودی از بیگانه هستند [11]. الگوی چندشکلی در MHC در راستای داشتن تعداد زیادی آلل با فراوانی میانه است که با انتخاب خنثی، تطابق نداشته و گویای وجود انتخاب سازشی در این ژنوم است [12]. مکانیزم‌های مختلفی برای توضیح چندشکلی وسیع در ژن‌های MHC بیان شده که عمده‌ترین آنها انتخاب وابسته به بروز پاتوژن‌ها و انتخاب وابسته به جنسیت است [13]. در انتخاب وابسته به جنسیت نظر بر این بوده که وجود تلاقی‌های غیرتصادفی و جهت‌دار منشا اصلی چندشکلی در ژن‌های MHC است. از آنجایی که افراد مشابه از نظر MHC احتمالاً با هم قرابت نزدیکی دارند، شناسایی خویشاوندان و پرهیز از تلاقی با آنها به‌منظور کاهش پیشامد همخوانی می‌تواند یکی دیگر از عملکردهای این ژن باشد [8]. گروهی از محققان با توجه به تاثیر جایگاه ژنی MHC در رفتارهای انتخاب جفت مولدین با محوریت افزایش شایستگی بقا در فرزندان، به پیامدهای مثبت بهره‌گیری از روش‌های تکثیر مبتنی بر فراهم‌کردن شرایط انتخاب تاکید نموده‌اند [14]. از آنجایی که ژن‌های MHC نقش کلیدی در ایمنی بازی می‌کنند، بنابراین از دیرباز تاثیر انتخاب ناشی از عوامل بیماری‌زا روی این ژن مورد بحث بوده است. این انتخاب زمانی کارایی دارد که فرم‌های مختلف ژن MHC قادر باشند فرد را مقابل عوامل پاتوژنی محافظت نمایند. وجود همبستگی میان آلل‌های MHC و مقاومت میزبان نسبت به عوامل باکتریایی، ویروسی، قارچی و عفونی در مطالعات مختلف در موجوداتی همچون موش، پرندگان، دام‌ها و آبزیان دیده شده است [8, 15, 16]. اولین گزارش درباره ژن‌های MHC در ماهیان استخوانی توسط هاشیموتو و همکاران در سال ۱۹۹۰ و در رابطه با کپور معمولی صورت گرفت [17]. جایگاه ژنی MHC در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) شامل خانواده‌ای از ژن‌های کلاسیک و غیرکلاسیک تحت عنوان *Cyca-YB* [17]، *Cyca-DAB1*01* و *Cyca-DAB2*01* [18] و همچنین *Cyca-DAB3*01* و *Cyca-DAB4*01* [19] است. مطالعات بعدی نشان داده است که *Cyca-DAB1*01* و *DAB1*01* (با وزن ۴۹۰ جفت‌باز) از یک سو

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی، ۱۳۸ نمونه باله‌ماهی فیتوفاگ تثبیت شده در اتانول ۹۶٪، از کارگاه‌های مختلف ایران شامل سه استان شمالی گیلان، مازندران و گلستان، استان خوزستان و همچنین نمونه‌هایی از ماهیان فیتوفاگ وارداتی از چین جمع‌آوری شد و تا زمان استخراج DNA در یخچال نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از پروتئیناز K با روش فنل-کلروفرم انجام شد [26] و نمونه‌های DNA پس از کنترل کیفی و کمی با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و نانودراپ ۲۰۰۰ (Thermo Fisher Scientific) ایالات متحده) تا زمان اجرای PCR در فریزر ۲۰°C- نگهداری شدند.

واکنش PCR: آغازگرهای مورد استفاده برای توالی ژن *MHC-DAB* کپور معمولی از GenBank با شماره دسترسی Z47757.1 تهیه شد که گونه نزدیک به فیتوفاگ بود و به‌منظور تکثیر آگرون، دو ژن *MHC-DAB* مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱) [25, 27].

جدول ۱) مشخصات آغازگر مورد استفاده در آنالیز ژن *MHC* در ماهی فیتوفاگ در دمای ۵۹°C

نام آغازگر	توالی آغازگر
ex2F	5'-tctgacataactgtaagtctgc-3'
ex2R	5'-caggagagatcagagtcttg-3'

برای هر واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی بافر کلرید منیزیم با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، دو واحد آنزیم Taq (Ampliqon)؛ دانمارک، ۴۰۰ میکرومولار دئوکسی‌نوکلئوزیدتری فسفات (dNTP) همراه با ۰/۲ میکرومولار هر جفت آغازگر رفت و برگشت (Macrogen؛ کره جنوبی)، ۱۰۰ نانوگرم DNA و آب مقطر استریل تا رسیدن به حجم نهایی استفاده شد. مرحله PCR به‌وسیله یک دستگاه ترمال‌سایکلر T100 (BIO-RAD؛ ایالات متحده) و با شرایط واکنش به‌صورت واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به‌مدت ۳ دقیقه، پس از آن واسرشته‌سازی در ۹۴°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر با دمای ۵۹°C به‌مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲°C به‌مدت ۵۰ ثانیه با تعداد ۳۵ چرخه و نهایتاً برای اتمام تکثیر، بسط پایانی با دمای ۷۲°C به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. طی عملیات الکتروفورز با ژل آگارز و به‌دست‌آمدن تک‌باند کاملاً واضح بدون باندهای اضافی، موفقیت مرحله PCR مورد تایید قرار گرفت.

تشخیص چندشکلی با روش SSCP: پس از مخلوط‌نمودن ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۱۵ میکرولیتر محلول واسرشته‌کننده (۹۸٪ فرمامید، ۱۰ میلی‌مولار اتیلن‌دی‌آمین تتراسدیک‌اسید، ۰/۲۵٪ زین-سیانول و ۰/۲۵٪ بروموفنول‌بلو)، در یک میکروتیوب به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵°C قرار داده شد و بلافاصله نمونه‌ها به باکس حاوی یخ منتقل شدند تا در اثر سرما DNAهای تک‌رشته‌ای با شوک دمایی ساختار سه‌بعدی پیدا کنند. پس از نگهداری در یخ به‌مدت ۱۵ دقیقه، بلافاصله در ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۰٪ بارگذاری‌شده با جریان الکتریسیته به‌میزان ۱۰ ولت به‌ازای هر سانتی‌متر از ژل و به‌مدت ۱۸ ساعت همراه با یک دستگاه میرد (DESAGA؛ هایدلبرگ؛ آلمان) الکتروفورز شدند [21]. درصد‌های مختلف گلیسرول و دماهای متفاوت برای به‌دست‌آمدن نتیجه مناسب مورد آزمون قرار گرفتند. رنگ‌آمیزی ژل طبق روش بنبوز و همکاران [28] انجام شد. پس از ارزیابی الگوی نواریندی میان نمونه‌های SSCP شده، ضمن مقایسه آنها با نتایج مطالعات

و *Cyca-DAB3*01* و *Cyca-DAB4*01* (با وزن ۹۰۰ جفت‌باز) از سوی دیگر با هم پیوستگی دارند [19].

تنوع بالا در جایگاه ژنی MHC به ایجاد آل‌های متنوعی منجر می‌شود که به‌صورت هاپلوتایپ‌های متفاوت میان جمعیت‌ها بروز می‌یابند. هر یک از آل‌ها توانایی اتصال و شناسایی به انواع مختلفی از پپتیدها را دارند، لذا پاسخ هر موجود زنده برابر پاتوژن‌ها متأثر از هاپلوتایپ‌های موجود برای جایگاه MHC است. مسلماً از جمله گزینه‌های برتر برای شناسایی این تنوع، استفاده از روش تعیین توالی است، اما تعداد زیاد نمونه‌ها در مطالعات جمعیتی، هزینه‌ها و زمان صرف‌شده در این روش، کاربرد روتین آن را در آزمایشگاه‌ها محدود می‌نماید. یکی از روش‌های مناسب برای این منظور استفاده از روش چندشکلی در ترکیب‌بندی تک‌رشته‌ای (SSCP) است که می‌توان از این روش به‌عنوان جایگزینی مناسب برای مطالعه تنوع در توالی‌ها بهره برد و در سال‌های اخیر در بسیاری از مطالعات پژوهشی مرتبط با آبزیان رواج یافته است [20, 21]. ماهیت تشخیصی این روش نه‌تنها براساس اختلاف وزنی بین قطعات DNA، بلکه مبتنی بر ویژگی‌های شیمیایی یا فیزیکی آنهاست [22].

به‌طور کلی فرآیند SSCP شامل مراحل اصلی تکثیر قطعه مورد نظر با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، واسرشته‌سازی محصول دورشته‌ای PCR با استفاده از محلول فرمامید و حرارت و الکتروفورز در یک ژل غیرواسرشته‌کننده پلی‌اکریل‌آمید است. در حالت واسرشتگی، DNA تک‌رشته‌شده تمایل به ایجاد پیوندهایی بین بازهای خود می‌یابد که فارغ از طول رشته، ضمن پیچ‌وتاب‌خوردن، شکل فضایی خاصی به آن می‌بخشد. وجود اختلاف در حتی یک نوکلئوتید می‌تواند سبب بروز اختلاف بین رشته‌ها و در نتیجه الگوی حرکتی آنها در ژل شود. یکی از کلیدی‌ترین مراحل در روش SSCP به‌دست‌آمدن محصول اختصاصی در مرحله PCR است که این موضوع با استفاده از ژل آگارز قابل بررسی است. عوامل موثر دیگر در این روش شامل اندازه قطعه تکثیرشده (حدود ۳۰۰ جفت‌باز و کمتر)، نوع ترکیب ژل پلی‌اکریل‌آمید (از نظر غلظت)، اندازه ژل و دمای محیط بافری ژل در طول زمان الکتروفورز، غلظت محصول به‌کاررفته در آنالیز، طول مدت اجرای الکتروفورز و استفاده از گلیسرول در ژل در کیفیت باند به‌دست‌آمده در پایان فرآیند SSCP هستند [23]. اگر چه مواردی همچون حساسیت‌های دمایی، نیاز به تکرار فرآیند الکتروفورز و لذا صرف زمان بیشتر و داشتن مهارت کافی از نکات قابل تامل در روش SSCP به شمار می‌روند، اما در عین حال سادگی روش و قدرت بالای تشخیص جهش در روش SSCP، ابزاری قدرتمند برای ارزیابی تنوع ژنتیکی را میان نمونه‌ها، افراد یا جمعیت‌های مختلف و به‌ویژه جهش‌های جدید و ناشناخته فراهم آورده است [24]. بررسی جایگاه *MHC-DAB II* در این پژوهش، اولین مطالعه درباره جایگاه ژنی مذکور در کپورماهیان کشور و به‌طور اختصاصی گونه فیتوفاگ یا کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) بود. با توجه به تولید بالای ماهی فیتوفاگ در ایران (۸۵۰۰۰ تن) از ۱۷۵۰۰۰ تن کل تولید کپورماهیان کشور [25] و محدودیت ذخایر آن به‌دلیل غیربومی‌بودن از یک سو و شرح پیشین درباره اهمیت ارزیابی پتانسیل‌های ژنتیکی سازشی در ارتباط با جمعیت‌های پرورشی و فقدان اطلاعات در این مورد، هدف پژوهش حاضر، کلونینگ، توالی‌یابی و شناسایی چندشکلی‌های جایگاه ژنی *MHC-DAB II* در ماهی فیتوفاگ بود.

پیشین^[27]، هاپلوتایپ‌های به‌دست‌آمده شناسایی و سپس کلون شدند.

کلونینگ، توالی‌یابی و آنالیز چندشکلی‌های شناسایی‌شده: به‌منظور تایید الگوهای به‌دست‌آمده، نمونه PCR شده هر نوع از هاپلوتایپ‌ها پس از خالص‌سازی و کلون‌نمودن در وکتور pTG19-T vector (Vivantis؛ مالزی) و مرحله ترانسفورمیشن با کمک باکتری *شریشیا کلی* سویه DH5a، ازدیاد باکتری‌ها در محیط کشت لایوژنی‌براث (LB) و تایید کلونینگ به‌واسطه نمونه‌برداری از نقاط سفید در هر پلیت، اجرای یک مرحله PCR با آغازگرهای M13 F و M13 R و نهایتاً استخراج پلاسمیدها توسط کیت GTP (شرکت پیشگامان انتقال ژن؛ ایران) به‌همراه آغازگر نام‌برده‌شده به‌منظور توالی‌یابی (MacroGene؛ کره جنوبی) ارسال شد. توالی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از ClustalW2 در نرم‌افزار Geneious 4.8.5^[29] هم‌ردیف و مرتب شدند. dN یا Ka بیانگر میزان اختلاف بین دو توالی مورد مقایسه در مکان‌های غیرهمسانی بوده که جایگزینی نوکلئوتیدی سبب تغییر در اسیدآمینه کدون مربوطه شده است. از آنجایی که نسبت دو عامل جایگاه‌های غیرهمسان (dN) و جایگاه‌های همسان (dS) به هم گویای میزان فشار ناشی از نیروی انتخاب طبیعی بوده، بنابراین این نسبت یکی از شاخص‌های مهم در بررسی وضعیت تنوع در جمعیت‌ها است. آنالیزهای مربوط به ترکیب و تنوع نوکلئوتیدی از جمله تخمین تعداد جایگزینی‌های نوکلئوتیدی مشابه و غیرمشابه با استفاده از روش نی و گاجبری همراه با اعمال تصحیح جوکس-کانتور^[30] با نرم‌افزار DnaSp 5.10^[31] صورت گرفت.

پس از هم‌ردیف‌نمودن توالی‌های به‌دست‌آمده در آل‌های شناسایی‌شده ژنوم MHC با توالی گونه مرجع (کپور معمولی) با استفاده از گزینه Blast در سایت بانک ژن جهانی (NCBI) مقایسه شدند. توالی‌های به‌دست‌آمده براساس روش کلین و همکاران^[32] نام‌گذاری شدند.

در درخت فیلوژنی ترسیم‌شده برای توالی‌ها، توالی جایگاه مشابه در کپور معمولی به‌عنوان شاخصی برای مقایسه با آل‌های مورد بررسی آورده شد. برای رسم درخت فیلوژنی از روش بیشترین درست‌نمایی استفاده شد. برای ساخت این درخت ضمن مقایسه داده‌های مربوط به توالی‌ها، مولفه‌های الگو و طول شاخه‌ها برای هر درخت محاسبه شد (بسته به تعداد تعیین‌شده در میزان تکرار یا بوت‌استرپ) و سپس درخت دارای بیشترین درست‌نمایی انتخاب شد. تحلیل‌های فیلوژنتیک با نرم‌افزار 7 MEGA^[30] انجام و برای محاسبه غنای آللی میان گروه‌های مختلف از برنامه FSTAT 2.9.3^[33] استفاده شد.

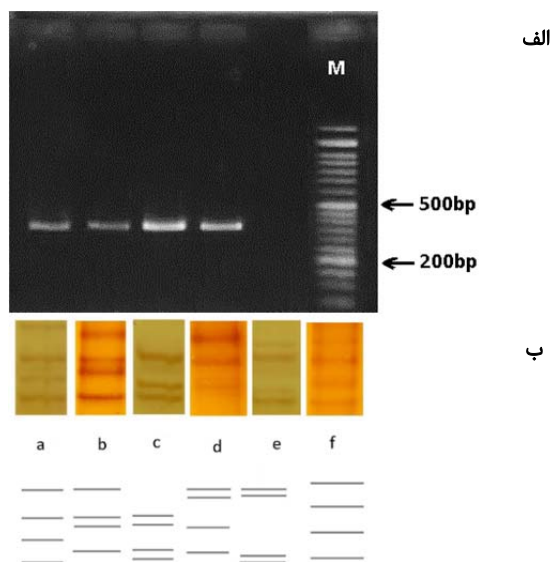
یافته‌ها

محصول واکنش PCR مربوط به جایگاه DAB ژنوم MHC کلاس II ماهی فیتوفاگ با وزن حدود ۳۵۰ جفت‌باز بدون هیچ گونه باند جانبی در نمونه‌های مورد مطالعه به دست آمد (شکل ۱- الف) و بیانگر تکثیر جایگاه ژنی *Hymo-DAB1*01/DAB2*1* در ماهی فیتوفاگ بود. بهترین نتیجه آنالیز SSCP با استفاده از کاربرد ۱۰٪ گلیسرول در ترکیب ژل و با دمای ثابت ۴°C حین الکتروفورز به دست آمد. پس از بررسی ژل‌های رنگ‌آمیزی‌شده مجموعاً شش الگوی مختلف قابل تشخیص بود (شکل ۱- ب). بیشترین فراوانی را هاپلوتایپ d با ۴۴٪ به خود اختصاص داد و هاپلوتایپ a و b با ۲٪ کمترین فراوانی را میان سایر الگوها نشان دادند که تنها در

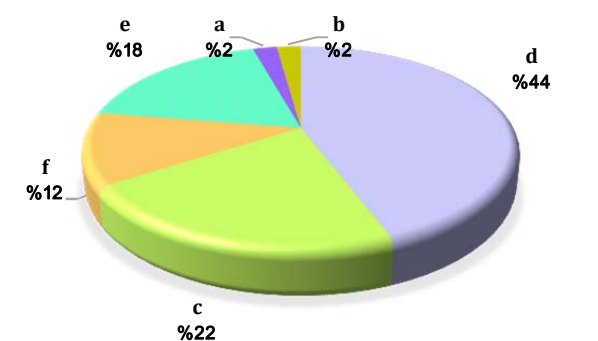
نمونه‌های دو استان گیلان و خوزستان قابل مشاهده بودند. بیشترین و کمترین تنوع هاپلوتایپی به‌ترتیب در جمعیت‌های خوزستان (۶: a, b, c, d, e, f) و مازندران (۳: c, d, e) مشاهده شد (نمودار ۱).

برای نخستین بار ۸ توالی به‌دست‌آمده برای ماهی فیتوفاگ در بانک ژن NCBI ثبت شد (جدول ۲). پس از هم‌ردیف‌نمودن توالی‌های به‌دست‌آمده در آل‌های شناسایی‌شده ژنوم MHC و مقایسه آنها با توالی گونه مرجع (کپور معمولی)، صحت آنها مورد تایید قرار گرفت و نام‌گذاری شدند (جدول ۱) که ۲۰۰ جفت‌باز آن و توالی اسیدآمینه‌های مربوطه تعیین شد (شکل ۲). میانگین اختلاف dN و dS بین آل‌ها به‌ترتیب معادل ۰/۲۵ و ۰/۳۰ بود و نسبت این دو عامل برابر با ۱/۲ به دست آمد که بیانگر وجود جریان انتخاب مثبت در جایگاه مورد بررسی بود. بیشترین اختلاف بین آل‌های ۸ و ۳ مشاهده شد (جدول ۲؛ شکل ۲).

بالاترین غنای آللی میان گروه‌های مختلف مورد بررسی، به نمونه‌های وارداتی از چین (۵) و گروه خوزستان (۴/۵) اختصاص یافت. کمترین غنای آللی میان نمونه‌های مازندران (۳/۸) مشاهده شد (شکل ۳).

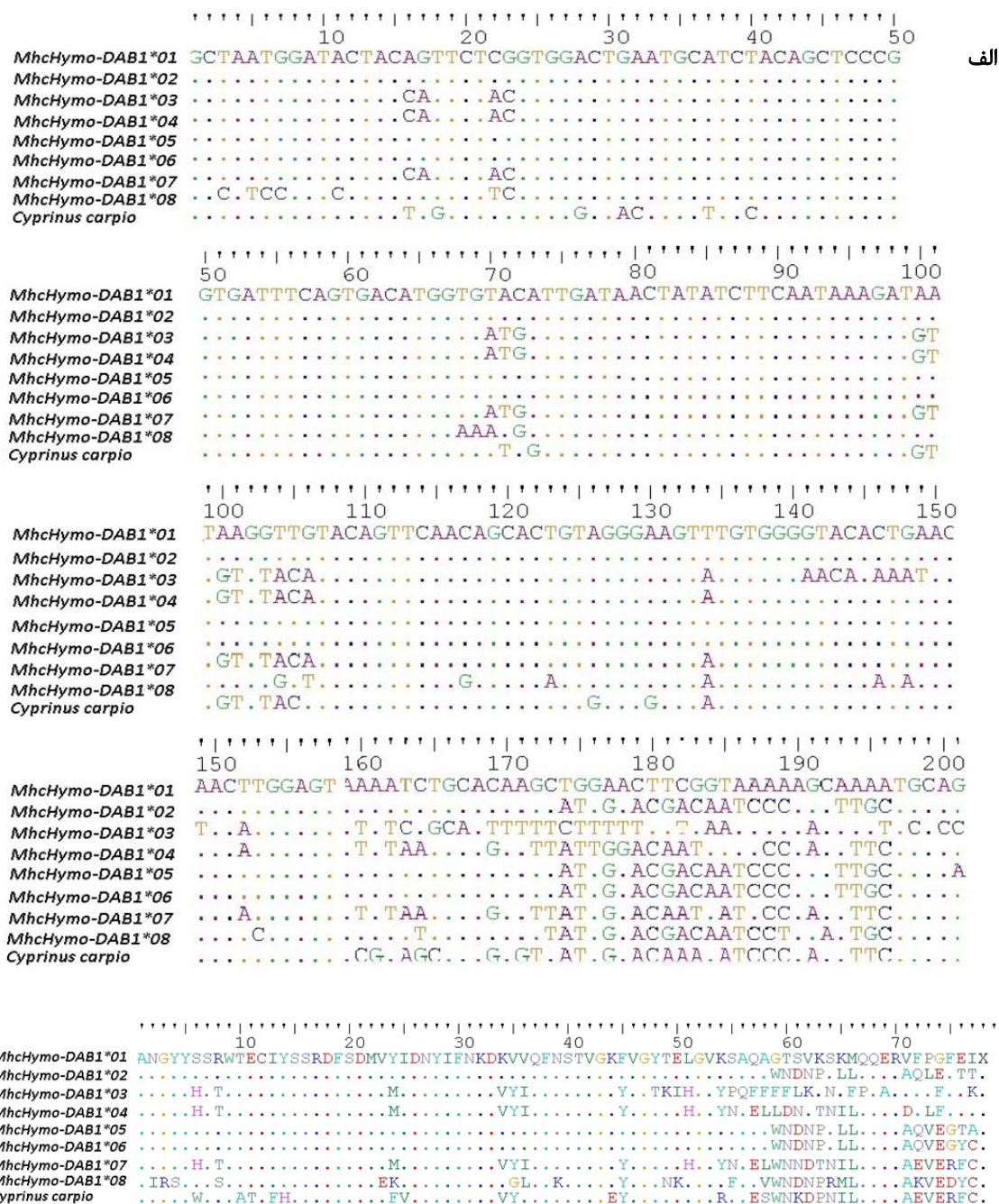


شکل ۱ محصول PCR جایگاه *MHC-DAB* کلاس II و آنالیز SSCP ژن *Hymo-DAB* در ماهی فیتوفاگ: الف- محصول PCR جایگاه *MHC-DAB* کلاس II در ماهی فیتوفاگ در آگارز ۱٪، (M) نشانگر وزنی استاندارد است، ب- آنالیز SSCP ژن *Hymo-DAB* در ماهی فیتوفاگ و شش هاپلوتایپ مختلف حاصله



نمودار ۱ فراوانی هاپلوتایپ‌های به‌دست‌آمده طی آنالیز SSCP ماهی فیتوفاگ (۱۳۸ نمونه)

کد ثبت‌شده برای توالی	جایگاه ژنی	<i>Hymo-DAB1*01</i>	<i>Hymo-DAB1*02</i>	<i>Hymo-DAB1*03</i>	<i>Hymo-DAB1*04</i>	<i>Hymo-DAB1*05</i>	<i>Hymo-DAB1*06</i>	<i>Hymo-DAB1*07</i>
LC164145	<i>Hymo-DAB1*01</i>							
LC164146	<i>Hymo-DAB1*02</i>	۰/۱۴۲۲						
LC164147	<i>Hymo-DAB1*03</i>	۰/۲۸۵۲	۰/۳۷۸۵					
LC164148	<i>Hymo-DAB1*04</i>	۰/۲۱۸۸	۰/۲۲۵۴	۰/۲۰۰۲				
LC159062	<i>Hymo-DAB1*05</i>	۰/۱۶۹۲	۰/۳۰۰۷	۰/۴۲۲۸	۰/۲۵۶			
LC159063	<i>Hymo-DAB1*06</i>	۰/۱۶۸	۰/۴۸۶	۰/۴۲۹۲	۰/۲۵۴۱	۰/۳۵۲		
LC159064	<i>Hymo-DAB1*07</i>	۰/۲۹۰۲	۰/۲۰۱۶	۰/۲۹۴۹	۰/۱۰۰۶	۰/۱۹۱۵	۰/۱۵۳۱	
LC164149	<i>Hymo-DAB1*08</i>	۰/۲۹۱	۰/۱۷۲۹	۰/۴۶۰۵	۰/۳۰۵۳	۰/۱۶۳۱	۰/۱۲۶۳	۰/۲۰۹۹



شکل ۲) توالی آلل‌های هم‌دیف‌شده در جایگاه *Hymo-DAB* در ماهی فیتوفاگ و مقایسه با کپور معمولی و توالی‌های اسیدآمینه متناظر با آلل‌های شناسایی شده در ماهی فیتوفاگ؛ الف- توالی آلل‌های هم‌دیف‌شده در جایگاه ژنی *Hymo-DAB* در ماهی فیتوفاگ و مقایسه با همتای این جایگاه در کپور معمولی (علامت (.) نشانه تشابه نوکلئوتیدی در آن مکان است)، ب- توالی‌های اسیدآمینه متناظر با آلل‌های شناسایی شده در آنالیز جایگاه *Hymo-DAB* در ماهی فیتوفاگ

اجرای آزمایشات ژنتیک مولکولی را نام برد. با توجه به نقش کلیدی ژن‌های MHC در ایمنی سازشی، تحقیق درباره ارتباط ژن‌های متنوع این جایگاه با مقاومت در برابر بیماری‌ها که در بسیاری از گونه‌ها اثبات شده است، شناسایی تنوع آلی و سطوح تنوع آن میان جمعیت‌های فیتوفاگ موجود در کشور در درجه اول و مطالعه درباره ارتباط این آلل‌ها با صفات مرتبط با شایستگی بقا به‌ویژه مباحث ایمنی پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

تنوع هاپلوتایپی حاصله در ماهی فیتوفاگ به ژن *Hymo-DAB1*01/DAB2*1* تعلق دارد و میان گروه‌های مختلف این گونه (گیلان، مازندران، گلستان، استان خوزستان و وارده از چین)، بیشترین تنوع هاپلوتایپی در جمعیت خوزستان و بالاترین غنای آلی مربوط به نمونه‌های وارداتی از چین است.

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

تأییدیه اخلاقی: مقاله حاضر از نظر اخلاقی پایبند وجوه مورد نظر در نظام اخلاقی انتشار مقالات بوده است.

تعارض منافع: اطلاعات ارائه‌شده در این مقاله با هیچ یک از سازمان‌ها یا تشکلهای علمی- پژوهشی در سطح کشور تعارض منافع ندارد.

سهم نویسندگان: محمدرضا کلباسی (نویسنده اول)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۳۰٪)؛ الهام جرفی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۵٪)؛ مجید صادقی‌زاده (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۲۰٪)؛ سیروس امیری‌نیا (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۵٪)

منابع مالی: این مطالعه در دانشگاه تربیت مدرس، در قالب رساله دکتری و با حمایت مالی دانشگاه مذکور انجام شد.

منابع

- 1- Kirk H, Freeland JR. Applications and implications of neutral versus non-neutral markers in molecular ecology. *Int J Mol Sci*. 2011;12(6):3966-88.
- 2- Reed DH, Frankham R. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv Biol*. 2003;17(1):230-7.
- 3- Sunnucks P, Wilson AC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC. SSCP is not so difficult: The application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol*. 2000;9(11):1699-710.
- 4- Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards SV. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends Ecol Evol*. 2003;18(5):249-56.
- 5- Meyers LA, Bull JJ. Fighting change with change: Adaptive variation in an uncertain world. *Trends Ecol Evol*. 2002;17(12):P551-7.
- 6- Hedrick PW. Balancing selection and MHC. *Genetica*. 1999;104(3):207-14.
- 7- Doherty PC, Zinkernagel RM. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature*. 1975;256(5512):50-2.
- 8- Penn DJ. The scent of genetic compatibility: Sexual selection and the major histocompatibility complex.

می‌کنند که آنتی‌ژن‌های مهاجم را به سلول‌های T معرفی می‌کنند. در مطالعه مشابه نیز که توسط راکوس و همکاران^[47] در ارتباط با تنوع جایگاه *MHC-DAB* به روش SSCP در ۸ لاین مختلف کپور معمولی در یک بانک ژن زنده صورت گرفت، ۷ هاپلوتایپ مختلف شناسایی شد که توالی‌یابی الگوهای متفاوت ضمن تأیید نتایج حاصله، توانایی روش SSCP برای تشخیص تفاوت‌ها را تا سطح نوکلئوتیدی به‌خوبی به نمایش گذاشت. مقایسه هاپلوتایپ‌های به‌دست‌آمده با مطالعات مشابه در این جایگاه و تعداد مشابه آنها^[27]، تنوع جمعیت‌های فیتوفاگ ایران را در وضعیت مناسبی قرار می‌دهد. غنای آلی مناسب جمعیت وارداتی از چین می‌تواند به‌عنوان نقطه قوت این مجموعه به شمار آید و این موضوع از حیث افزایش تنوع در این جایگاه میان جمعیت‌های پرورشی فیتوفاگ ایران اهمیت خاصی می‌یابد. در مطالعه راکوس و همکاران که در ارتباط با تنوع جایگاه *MHC-DAB* به روش SSCP در ۸ لاین مختلف کپور معمولی در یک بانک ژن زنده صورت گرفته است، فراوان‌ترین هاپلوتایپ (a) در همه جمعیت‌ها به‌جز دو گروه مشاهده شد. از میان ۷ هاپلوتایپ شناسایی‌شده، ۳ هاپلوتایپ به جمعیت‌های مونومورف (تنها یک هاپلوتایپ را نشان دادند) از ۳ لاین مورد بررسی تعلق داشتند و بیشترین تنوع در لاین لیتوانیایی (Lit) با تعداد ۴ هاپلوتایپ به دست آمد^[47]. در مطالعه حاضر دو هاپلوتایپ a و b تنها در نمونه‌های گیلان و خوزستان مشاهده شدند، در حالی که مازندران با ۳ نوع هاپلوتایپ کمترین تنوع را میان گروه‌های مختلف نشان داد، حداکثر تنوع (۶) میان جمعیت خوزستان به دست آمد.

محاسبات مربوط به غنای آلی نیز نتایج مشابهی در رابطه با مقایسه میان گروه‌های مختلف به دست داد. در طول دهه‌های گذشته تکثیر مداوم فیتوفاگ عمدتاً در کارگاه‌های کشور سه استان شمالی ایران شامل گیلان، مازندران و گلستان و استان خوزستان در جنوب صورت گرفته است و در این میان واردات گل‌های خارجی چینی یا اروپایی به‌صورت پراکنده و بدون شناسنامه ژنتیکی مشخص از یک سو و تبادلات مولدین و بچه‌ماهی بین کارگاه‌های مختلف و ورود آنها به چرخه تکثیر از سوی دیگر، امکان قضاوت درباره ماهیت نژادی فیتوفاگ موجود در ایران را مشکل می‌نماید. بروز اختلاف‌های مشاهده‌شده در گروه‌های مختلف می‌تواند به‌علت حضور لاین‌های مختلف از این گونه و تحت تأثیر تغییرات جریان‌های ژنی صورت گرفته باشد. حضور هاپلوتایپ‌های اختصاصی میان گروه‌های مطالعه‌شده ضمن آن که لزوم اجرای مدیریتی آگاهانه‌تر را بارز می‌نماید، می‌تواند به‌عنوان شاخصی ارزشمند در شناسایی ذخایر مختلف این گونه مورد بهره‌برداری قرار گیرد^[50]. این موضوع نیاز و اهمیت اجرای مطالعات وسیع‌تر و دقیق‌تر برای ارزیابی جمعیت‌های فیتوفاگ موجود در کشور را در درجه اول از نظر فراوانی آلی و سطح تنوع آلی و در مراحل بعدی تأثیر و ارتباط را بارزتر می‌سازد. نتایج حاصل از این مطالعه وضعیت تنوع آلی را در رابطه با یکی از کلیدی‌ترین جایگاه‌های ژنی مرتبط با مباحث بهداشتی و ایمنی در گونه فیتوفاگ فراهم کرد.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان مواردی همچون دسترسی به کارگاه‌های تکثیر ماهیان کپور در نقاط مختلف کشور و امکان نمونه‌برداری از ماهیان مولد (با توجه به حساسیت کارگاه‌داران نسبت به دستکاری ماهیان)، فقدان تجربه قبلی در ارتباط با مطالعه جایگاه ژنی هدف در ماهی فیتوفاگ و تنظیم شرایط بهینه آزمایشگاهی به‌منظور کسب بهترین نتایج و بودجه محدود برای

j/en

26- Hillis DM. Molecular systematics. 2nd Edition. Hillis DM, Moritz C, Mable BK, University David M Hillis, editors. Oxford: Oxford University Press, Incorporated; 1996.

27- Yu H, Tan S, Zhao H, Li H. MH-DAB gene polymorphism and disease resistance to *Flavobacterium columnare* in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Gene*. 2013;526(2):217-22.

28- Benbouza H, Jacquemin JM, Baudoin JP, Mergeai G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol Agron Soc Environ*. 2006;10(2):77-81.

29- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Heled J, Kearse M, et al. Geneious, 4.8.5 [Internet]. 2010 [cited 20 June 2016]. Available from: <https://www.geneious.com/products/prime/resources/download/previous-versions/>

30- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33(7):1870-4.

31- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009;25(11):1451-2.

32- Klein J, Bontrop RE, Dawkins RL, Erlich HA, Gyllenstein UB, Heise ER, et al. Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: A proposal. *Immunogenetics*. 1990;31(4):217-9.

33- Goudet J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices version 2.9.3 [Internet]. Lausanne: UNIL, Université de Lausanne; 2001 [cited 15 May 2016]. Available from: <http://www.citeulike.org/user/argosmarulanda/article/7617994>

34- Johansson ML, Clifford K, Fodness B, Vazquez NA, Banks MA. 2012. Mate selection in captive-breeding rockfishes *Sebastes* spp.: Inference from parentage analysis and the major histocompatibility complex (MHC). *Mar Ecol Prog Ser*. 2012;460:195-206.

35- Evans ML, Neff BD, Heath DD. Behavioural and genetic analyses of mate choice and reproductive success in two Chinook salmon populations. *Can J Fish Aquat Sci*. 2013;70(2):263-70.

36- Penn D, Potts W. MHC-disassortative mating preferences reversed by cross-fostering. *Proc Biol Sci*. 1998;265(1403):1299-306.

37- Wiegertjes GF, Bongers AB, Voorthuis P, Zandieh Doulabi B, Groeneveld A, Van Muiswinkel WB, et al. Characterization of isogenic carp (*Cyprinus carpio* L.) lines with a genetically determined high or low antibody production. *Anim Genet*. 1996;27(5):313-9.

38- Langefors A, Lohm J, Grahn M, Andersen O, Von Schantz T. Association between major histocompatibility complex class IIB alleles and resistance to *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon. *Proc Biol Sci*. 2001;268(1466):479-85.

39- Miller KM, Winton JR, Schulze AD, Purcell MK, Ming TJ. Major histocompatibility complex loci are associated with susceptibility of Atlantic salmon to infectious hematopoietic necrosis virus. *Environ Biol Fish*. 2004;69(1-4):307-16.

40- Hetland DL, Jørgensen SM, Skjødtt K, Dale OB, Falk K, Xu C, et al. In situ localisation of major histocompatibility complex class I and class II and CD8 positive cells in Infectious Salmon Anaemia Virus (ISAV)-infected Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immunol*. 2010;28(1):30-9.

Ethology. 2002;108(1):1-21.

9- Kruiswijk CP, Hermesen T, Van Heerwaarden J, Dixon B, Savelkoul HF, Stet RJ. Major histocompatibility genes in the Lake Tana African large barb species flock: Evidence for complete partitioning of class II B, but not class I, genes among different species. *Immunogenetics*. 2005;56(12):894-908.

10- De Eyto E, McGinnity P, Consuegra S, Coughlan J, Tufto J, Farrell K, et al. Natural selection acts on Atlantic salmon Major Histocompatibility (MH) variability in the wild. *Proc Biol Sci*. 2007;274(1611):861-9.

11- Nei M, Hughes AL. Polymorphism and evolution of the major histocompatibility complex loci in mammals. In: Selander RK, Clark AG, Whittam TS, editors. *Evolution at the molecular level*. Oxford: Oxford University Press, Incorporated; 1991. p. 222.

12- Larson WA, Seeb JE, Dann TH, Schindler DE, Seeb LW. Signals of heterogeneous selection at an MHC locus in geographically proximate ecotypes of sockeye salmon. *Mol Ecol*. 2014;23(22):5448-61.

13- Ujvari B, Belov K. Major Histocompatibility Complex (MHC) markers in conservation biology. *Int J Mol Sci*. 2011;12(8):5168-86.

14- Chargé R, Teplitsky C, Sorci G, Low M. Can sexual selection theory inform genetic management of captive population? A review. *Evolut Appl*. 2014;7(9):1120-33.

15- Landry C, Bernatchez L. Comparative analysis of population structure across environments and geographical scales at major histocompatibility complex and microsatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mol Ecol*. 2001;10(10):2525-39.

16- Sommer S. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Front Zool*. 2005;2:16.

17- Hashimoto K, Nakanishi T, Kurosawa Y. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(17):6863-7.

18- Ono H, O'hUigin C, Vincek V, Stet RJ, Figueroa F, Klein J. New beta chain-encoding Mhc class II genes in the carp. *Immunogenetics*. 1993;38(2):146-9.

19- Van Erp SH, Egberts E, Stet RJ. Characterization of class II A and B genes in a gynogenetic carp clone. *Immunogenetics*. 1996;44(3):192-202.

20- Aurelle D, Berrebi P. Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta*, L.) populations from south-western France: Data from mitochondrial control region variability. *Mol Ecol*. 2001;10(6):1551-61.

21- Liu ZJ, Cordes JF. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*. 2004;238(1-4):1-37.

22- Kumari N, Thakur SK, Kumar D, Kumari K. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) - a review. *Indian Res J Genet Biotechnol*. 2015;7(1):27-34.

23- Gasser RB, Hu M, Chilton NB, Campbell BE, Jex AJ, Otranto D, et al. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nat Protoc*. 2006;1(6):3121-8.

24- Konnai S, Nagaoka Y, Takesima S, Onuma M, Aida Y. Technical note: DNA typing for ovine MHC DRB1 using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *J Dairy Sci*. 2003;86(10):3362-5.

25- Fisheries and Aquaculture Department. FishStatJ - software for fishery statistical time series [Internet]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2016 [cited 10 June 2016]. Available from: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat>

2013;51(1-2):139-46.

46- Jia Z, Chi X, Li C, Shi L. Development of MHC class I and II B primers in common carp and its molecular characterization. *Biochem Genet.* 2010;48(7-8):690-5.

47- Rakus KŁ, Wiegertjes GF, M Stet RJ, J Savelkoul HF, Pilarczyk A, Irnazarow I. Polymorphism of major histocompatibility complex class II B genes in different lines of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat Living Resour.* 2003;16(5):432-7.

48- Ortí G, Hare MP, Avise JC. Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. *Mol Ecol.* 1997;6(6):575-80.

49- Grimholt U, Larsen S, Nordmo R, Midtlyng P, Kjoeglum S, Storset A, et al. MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci. *Immunogenetics.* 2003;55(4):210-9.

50- Kalinowski ST. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv Genet.* 2004;5(4):539-43.

41- Ristow SS, Grabowski LD, Thompson SM, Warr GW, Kaattari SL, De Avila JM, et al. Coding sequences of the MHC class II beta chain of homozygous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Comp Immunol.* 1999;23(1):51-60.

42- Peters MB, Turner TF. Genetic variation of the major histocompatibility complex (MHC class II β gene) in the threatened Gila trout, *Oncorhynchus gilae gilae*. *Conserv Genet.* 2008;9(2):257-70.

43- Kuroda N, Figueroa F, O'hUigin C, Klein J. Evidence that the separation of Mhc class II from class I loci in the zebrafish, *Danio rerio*, occurred by translocation. *Immunogenetics.* 2002;54(6):418-30.

44- Godwin UB, Flores M, Quiniou S, Wilson MR, Miller NW, Clem LW, et al. MHC class II A genes in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev Comp Immunol.* 2000;24(6-7):609-22.

45- Dong ZD, Zhao Y, Zeng QF, Fu Y, Zhou FN, Ji XS, et al. Molecular cloning and polymorphism of the Major Histocompatibility Complex (MHC) class IIB gene of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Biochem Genet.*