شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۴، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰
صفحات ۴۸۳-۴۶۷

ردیابی QTLهای مرتبط با صفات رشد در ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*, Kamensky, 1901) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

سهیلا فیض بخش کوفلی[۱]، حمید فرحمند[۲*]، امیررضا عابد علم دوست[۳]، رضا خمیرانی[۴]

۱. کارشناس ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۲. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۳. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۴. کارشناس، مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان استخوانی شهید انصاری رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۲

چکیده

ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) یکی از گونه‌های مهم اقتصادی شمال ایران است. این آزمایش به‌منظور شناسایی QTLهای مرتبط با صفات رشد (وزن لاشه و طول کل) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) صورت گرفت. مولدین آماده تکثیر از یک جمعیت وحشی وارد شده به رودخانه سفیدرود انتخاب شدند. یازده خانواده خویشاوند تنی از تکثیر ۲۲ جفت مولد نر و ماده ماهی سفید به‌دست آمد. نتاج حاصل پس از طی یک دوره سه ماهه پرورشی برداشت و در الکل ۹۶ درصد ذخیره شدند. از مجموع نتاج به‌دست‌آمده ۷۵ نمونه انتخاب شدند. DNA مولدین و نتاج استخراج طبق پروتکل شد. از کاربرد چهار نشانگر ریزماهواره (HLJ2225، HLJ3366، HLJ3988 و HLJ2316) مرتبط با صفات رشد(طول کل و وزن کل) در مجموع ده لوکوس(۱۳ ژنوتیپ) شامل لوکوس‌های HL1، HL2، HL3، HL4، HL5، HL6، HL7، HL8، HL9 و HL10 با استفاده از نرم‌افزار AlphaEaseFC انتخاب و نمره‌دهی شدند. تعداد الل‌های هر لوکوس(N_A)، تعداد الل‌های مؤثر هر لوکوس(N_E)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار(H_e)، هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده(H_o)، شاخص تثبیت(F)، تعادل هاردی-واینبرگ، PIC، F_{st}، R_{st}، عدم تعادل پیوستگی(LD)، ضریب همبستگی پیرسون و رگرسیون در جمعیت مولدین و نتاج با استفاده از نرم‌افزارهای GenAlEx 6.1، Arlequin ver. 3.5.2 و Excel 2013 بررسی شدند. نتیجه بررسی‌ها نشان داد همه لوکوس‌های فوق‌الذکر برای کاربرد در برنامه به‌گزینی به‌کمک نشانگر (MAS) مناسب هستند. وراثت‌پذیری لوکوس‌ها برای طول و وزن کل محاسبه شد. براساس LD پنج گروه اتصال وراثت‌پذیر برای طول کل (شامل LG1، LG2، LG3، LG4 و LG5) ساخته شد. گروه اتصال LG4 متشکل از هشت لوکوس(HL3، HL4، HL5، HL6، HL7، HL8، HL9 و HL10) جهت گزینش خانواده‌ها انتخاب شد. در مجموع شش خانواده بر مبنای گروه اتصال LG4 انتخاب شدند. این تحقیق نشان داد که کاربرد نشانگرهای مولکولی ریزماهواره مرتبط با صفات رشد گونه‌های نزدیک به ماهی سفید (*R. frisii kutum*) می‌تواند به ردیابی QTLهای صفات رشد در این گونه با اهمیت تجاری کمک کند.

واژگان کلیدی: به‌گزینی به‌کمک نشانگر(MAS)، وراثت‌پذیری، عدم تعادل پیوستگی(LD)، گزینش بر مبنای گروه اتصال(LGS)، QTL

* نویسنده مسئول: حمید فرحمند
Email: hfarahmand@ut.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 74, No. 4, Winter 2021
pp. 467-483

Detecting QTLs associated with growth traits in Caspian Kutum (*Rutilus frissi kutum*, Kamensky, 1901) using microsatellite markers

Soheila Feyzbakhsh Kofeli[1], Hamid Farahmand[2*], Amirreza Abed Elmdoust[3], Reza Khomeirani[4]

1. MSc graduate, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
4. BSc graduate, Shahid Ansari restocking and protection of teleosties genetic resources center, Rasht, Iran.

Received: 16-Mar-2021 Accepted: 12-May-2021

Abstract

Southern Caspian Kutum, *Rutilus frisii kutum* (Kamensky, 1901) is an important economic species in north of Iran. This study was conducted in order to identifying QTLs associated with growth traits, body weight and total length, in Caspian Kutum (*R. frisii kutum*) using microsatellites from close species, Common Carp (*cyprinus carpio*). The eleven full-sibs family were produced by mating between eleven male and eleven female that were collected from Sefid Rood river. Sampling was accomplished from broodstock caudal fin. Three month after hatch the offspring were collected and stored in alcohol 96%. Altogether 75 offspring were sampled. Genomic DNA was isolated from broodstock and offspring according to the protocol. With applying four microsatellite markers (HLJ2225, HLJ3366, HLJ3988, and HLJ2316) related to growth traits, altogether 10 loci, 13 genotype, were selected for performing statistical analyses. Genotyping was accomplished using AlphaEaseFC software. Statistical analyses were performed by GenAlEx 6.1, Arlequin ver. 3.5.2 and Excel 2013 softwares. Investigating the number of alleles per locus, effective number of alleles per locus, expected heterozygosity, observed heterozygosity, fixation index, polymorphic information content, R and F statistics, Hardy-Weinberg equilibrium showed that these loci, HL1, HL2, HL3, HL4, HL5, HL6, HL7, HL8, HL9 and HL10, were suitable for applying in marker-assisted-selection (MAS) program for Caspian Kutum (*R. frisii kutum*). The heritability was calculated for each locus, for total length and total weight. Then based on linkage disequilibrium five heritable linkage group, LG1, LG2, LG3, LG4 and LG5, were constructed for total length in Caspian Kutum (*R. frisii kutum*). The LG4 with eight loci (nine genotype), including loci HL3, HL4, HL5, HL6, HL7, HL8, HL9 and HL10, was selected for family linkage group selection (LGS). The LG4 had a relatively average heritability (h^2 = 0/432). Altogether, six family based on LG4 were selected to use in *R. frisii kutum* selective breeding program. This study showed that using microsatellite markers related to growth traits in close species to Caspian Kutum (*R. frisii kutum*) can aid to identifying QTLs associated with growth traits in Caspian Kutum, an important commercial species.

Key words: Marker assisted selection (MAS); Heritability; Linkage disequilibrium (LD); Linkage group selection (LGS); QTL

Corresponding author: Hamid Farahmand Email:hfarahmand@ut.ac.ir

۱. مقدمه

ماهی سفید (Rutilus frisii kutum) از خانواده Cyprinidae و بومی دریای خزر (شمال ایران) است. جمعیت ماهی سفید طی چهار دهه (از سال‌های ۱۹۴۰ تا ۱۹۸۰) به‌علت صید بیش از حد و از دست‌رفتن مناطق تخم‌ریزی به‌تدریج کاهش یافته است (Alaei Brujeni *et al.*, 2015). این گونه یکی از گونه‌های با اهمیت اقتصادی و شیلاتی دریای خزر است. با وجود تلاش‌های صورت‌گرفته برای تکثیر مصنوعی و باز سازی ذخایر، میانگین طول و وزن ماهی سفید صیدشده در سواحل ایرانی دریای خزر طی سال‌های ۱۳۷۰ لغایت ۱۳۸۲ روندی کاهشی را طی نموده است (Afraei Bandpei *et al.* 2010). بنابراین ضرورت اهلی‌سازی و اصلاح نژاد این گونه جهت پرورش در اسارت به‌وضوح احساس می‌شود.

رشد یک صفت مهم مورد توجه در پرورش آبزیان اقتصادی است و توسط چندین ژن(لوکوس‌های صفت کمّی (QTL)[1]) و فاکتورهای محیطی کنترل می‌شود. نرخ رشد سریع‌تر دوره پرورش را کوتاه می‌کند و لذا یکی از اهداف اصلی بسیاری از برنامه‌های اصلاح نژاد ماهیان است. روش‌های سنتی بهبود ژنتیکی به‌طور عمده متکی بر انتخاب خانواده و فرد براساس فنوتیپ و اطلاعات شجره هستند (Liu *et al.*, 2016). یک یا تعداد زیادی QTL می‌توانند در یک صفت یا فنوتیپ شرکت کنند. وقتی بیشتر از یک QTL یک صفت به‌خصوص را تحت تأثیر قرار می‌دهند، هر یک ممکن است اندازه مؤثر متفاوتی داشته باشند و اثرات QTLهای افراد می‌تواند از قوی به ضعیف تغییر کند و اثر متقابل بین QTLها امری عادی است (Chistiakov *et al.*, 2006). با توسعه زیست‌فناوری مولکولی، به‌گزینی به‌کمک مارکر (MAS)[2]در بسیاری برنامه‌های اصلاح نژاد ژنتیکی ماهیان به‌کار می‌رود و علاوه‌بر داشتن دقت و کارایی بالا به نیروی کار و زمان کمتری در مقایسه با روش‌های سنتی اصلاح نژاد نیاز دارد. اولین مرحله MAS شناسایی مارکرهای ژنتیکی در دسترس یا ژن‌های مرتبط با صفات هدف است (Liu *et al.*, 2016).

نشانگرهای ریزماهواره برای کاربرد در برنامه‌های اصلاح نژادی به‌کمک مارکر مفید هستند. به‌گزینی به‌کمک مارکر بر مبنای حضور یک مارکر به‌طور محکم پیوندیافته به ژن امکان‌پذیر است و برای دستیابی به این هدف، داشتن نقشه‌های متراکم و دقیق اشباع از نشانگرهای مجاور لوکوس هدف (ژن) مهم است. ریزماهواره‌ها نشانگرهای منتخب برای ساخت نقشه‌های اتصال باقی مانده‌اند (Chistiakov *et al.*, 2006) که برای فهم محل دقیق فیزیکی ژن‌های تأثیرگذار روی صفات فنوتیپی در مطالعات آزمون لوکوس‌های صفت کمّی (QTL) ضروری هستند (Gilbey *et.al.*, 2004). مطالعه‌ای توسعه اولین نسل گروه اتصال با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریزماهواره آبالون لب‌سیاه (*Haliotis rubra*) را در یک خانواده خویشاوند تنی منفرد گزارش کرد. این نقشه اتصال برای کاربرد به‌عنوان یک چهارچوب برای نقشه‌یابی QTL و نیز کاربرد احتمالی در گزینش مبتنی‌بر نشانگر مناسب بود (Baranski *et. al.*, 2006). اولین نقشه اتصال ژنتیکی باس دریایی اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ساخته شد و تراکم مناسبی برای کاربرد در نقشه‌یابی QTL داشت (Chistiakov *et al.*, 2005). اولین نسل نقشه اتصال کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) به‌عنوان اولین نقشه اتصال یک گونه ماهی خوراکی منبع با ارزشی برای نقشه‌یابی اختلاف فنوتیپی فراهم کرد (Xia *et al.*, 2010). در مطالعه‌ای یک روش جدید ژنتیکی(گزینش برمبنای گروه اتصال (LGS)) توصیف شد که به دستیابی سریع مکان ژن‌های کدکننده فنوتیپ‌های قابل انتخاب انگل‌های مالاریا انجامید (Culleton *et al.*, 2005). از طرف دیگر،

[1] Quantitative trait loci
[2] Marker assisted selection

بسط بین گونه‌ای ریزماهواره‌ها امکان انطباق‌دادن اطلاعات ژنتیکی یا نقشه پیوستگی ژنتیکی از یک گونه به گونه دیگر را فراهم می‌کند (Chistiakov *et al.*, 2006). به‌عنوان مثال یک لوکوس جداسازی‌شده از ماهی سیم سرطلایی (*Sparus aurata*) به‌طور موفقیت‌آمیزی در DNA ژنومی ماهی باس دریایی (*D. labrax*) به کار برده‌شد (Chistiakov *et al.*, 2005). بنابراین می‌توان نشانگرهای ریزماهواره را برای ژنتیک جمعیت و سایر کاربردها بدون نیاز به سرمایه‌گذاری در جداسازی ریزماهواره‌های پلی‌مورفیک به‌کار برد (Chistiakov *et al.*, 2006). در مطالعه‌ای ۱۳۴ نشانگر ریزماهواره برای کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) توسعه داده شد. همه این لوکوس‌ها توانستند به‌طور موفقیت‌آمیزی در کپور سرگنده (*Hypophthalmichthys nobilis*) با ۶۵ لوکوس پلی‌مورفیک تکثیر شوند که نشان‌دهنده قابلیت انتقال بالای این ریزماهواره‌ها در میان گونه‌ها است (Guo *et al.*, 2013). نقشه‌های اتصال ایجادشده از نشانگرهای پلی‌مورفیک مختص گونه یکی از ابزارهای ژنتیکی ضروری جهت اجرای تحقیقات جامع برای لوکوس‌های تأثیرگذار بر فنوتیپ(های) مورد نظر است به‌خصوص آن‌هایی که به صفات مهم تجاری متصل هستند (Chistiakov *et al.*, 2005).

دو رویکرد اصلی یافتن ژن‌های مستعد(لوکوس‌های صفت کمّی (QTL)) که صفات کمّی را با کمک نشانگرهای مولکولی تحت تأثیر قرار می‌دهند شامل: ۱) آنالیز پیوستگی (LA) بر مبنای اجزای واریانس با استفاده از اطلاعاتی که درون خانواده‌ها/ شجره‌ها وجود دارد و ۲) نقشه‌برداری عدم تعادل پیوستگی (LD) همچنین معروف به نقشه‌یابی پیوستگی بر مبنای جمعیت است. در هر دو آنالیز آنچه که مورد علاقه بوده یافتن سیگنالی مبنی بر پیوستگی نزدیک بین یک نشانگر و یک QTL است. ترکیب این دو رویکرد(یعنی LD و LA) در یک آنالیز منفرد به‌عنوان LDLA شناخته می‌شود که از نظر آماری آنالیز بسیار قوی و نیرومندی به‌دست می‌دهد زیرا اطلاعات پیوستگی فقط سیگنال‌های پیوستگی واقعی را تأیید می‌کند (Pikkuhookana & Sillanpää, 2014). یک فرض عمومی در روش‌های آنالیز پیوستگی این است که افراد بنیان‌گذار با والدین نامشخص، غیرخویشاوند و غیرهم‌خون هستند (Lund *et al.*, 2003). هدف از اجرای این تحقیق ردیابی QTLهای مرتبط با صفات رشد (طول کل و وزن کل) در ماهی سفید با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ثبت‌شده برای صفات رشد کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بود.

۲. مواد و روش‌ها

۱،۲. خانواده‌های مرجع و نمونه‌برداری

تعداد ۲۲ مولد نر و ماده ماهی سفید آماده تکثیر از جمعیت‌های وحشی واردشده به رودخانه سفیدرود به‌طور تصادفی انتخاب شدند. بیومتری مولدین انجام شد. تعیین سن مولدین با استفاده از فلس صورت گرفت. مولدین نر و ماده هم‌سن به‌صورت یک به یک تکثیر شدند و ۱۱ خانواده خویشاوند تنی به‌دست آمد. کل نتاج به‌دست آمده سه ماه پس از تفریخ برداشت و در الکل اتانول ۹۶٪ نگهداری شدند. از هر خانواده تعدادی بچه‌ماهی با روش نمونه‌گیری تصادفی طبقه‌بندی‌شده انتخاب شدند. در مجموع ۷۵ نمونه بچه ماهی از کل خانواده‌ها انتخاب شدند. طول کل و وزن کل نتاج نمونه‌برداری‌شده اندازه‌گیری و ثبت شد. اطلاعات مربوط به طول و وزن مولدین و نتاج حاصل از خانواده‌های مختلف در جدول ۱ آورده شده‌است. DNA ژنومی از باله دمی مولدین و بچه‌ماهیان با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناکلون (SinaPure®DNA KIT) طبق دستورالعمل شرکت استخراج شد. سپس خلوص و غلظت DNA استخراج شده توسط NANODROP 2000C سنجیده شد. نمونه‌های DNA استخراج‌شده در دمای ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هنگام تهیه مخلوط PCR رقیق‌سازی همه نمونه‌های DNA به‌غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر انجام شد.

جدول ۱- اطلاعات مربوط به طول کل و وزن کل مولدین و نتاج ماهی سفید به تفکیک خانواده‌ها (همه نتاج در سن سه ماهگی برداشت شده‌اند).

شماره خانواده	کد مولدین	جنسیت مولدین	سن مولدین(سال)	وزن کل مولدین (گرم)	طول کل مولدین (سانتی‌متر)	کد نتاج	وزن کل نتاج (گرم)	طول کل نتاج (سانتی‌متر)
یک	۱۶	ماده	۵	۱۷۲۵	۵۸	۶۳	۱/۶۶	۶/۱
						۶۴	۱/۲۹	۵/۸
						۶۵	۰/۲	۳/۱
						۶۶	۰/۴۶	۴/۰
	۳۱	نر	۵	۱۰۹۵	۴۹	۶۷	۰/۱۳	۲/۸
						۶۸	۲/۰	۶/۵
						۶۹	۰/۹۳	۵/۰
						۷۰	۰/۲۵	۳/۴
شش	۲	ماده	۵	۱۰۲۵	۴۸	۵۷	۱/۹۴	۶/۵
						۵۸	۱/۱۹	۵/۶
	۱۹	نر	۵	۶۳۵	۴۱	۵۹	۰/۳۵	۳/۷
چهار	۸	ماده	۵	۱۰۹۰	۵۰	۱	۰/۴۲	۳/۸
						۲	۰/۸۴	۴/۸
						۳	۰/۶۶	۴/۳
						۴	۱/۹۲	۶/۵
	۱۱	نر	۵	۶۸۰	۴۲	۵	۰/۲	۳/۲
						۶	۱/۶۴	۵/۹
						۷	۰/۳۴	۳/۷
نُه	۲۰	ماده	۵	۴۹۰	۴۰	۶۰	۰/۵	۴/۳
						۶۱	۰/۳۵	۳/۹
	۳۰	نر	۵	۷۸۵	۴۵	۶۲	۰/۵۳	۴/۳
سه	۲۳	ماده	۵	۱۰۶۵	۵۱	۳۰	۱/۶۴	۵/۹
						۳۱	۰/۸۳	۴/۹
						۳۲	۰/۶	۴/۴
	۱۸	نر	۵	۸۸۵	۴۵	۳۳	۱/۶۶	۶/۰
						۳۴	۰/۴۵	۴/۰
						۳۵	۰/۳۸	۳/۸
یازده	۲۷	ماده	۵	۵۵۰	۴۱	۱۷	۰/۸۵	۵/۰
						۱۸	۰/۲۶	۳/۴
						۱۹	۰/۱۵	۲/۹
	۲۹	نر	۵	۸۶۰	۴۶	۲۰	۰/۶۷	۴/۶
						۲۱	۰/۷۷	۴/۷
						۲۲	۱/۷۲	۶/۱
دو	۷	ماده	۶	۱۰۹۰	۵۱	۸	۰/۱۸	۳/۰
						۹	۰/۹۴	۴/۸
						۱۰	۰/۳۲	۳/۵
						۱۱	۰/۹۱	۴/۹
	۲۴	نر	۶	۷۸۰	۴۴	۱۲	۲/۴۱	۶/۸
						۱۳	۳/۱۲	۷/۴
						۱۴	۰/۶۴	۴/۳
						۱۵	۰/۲	۳/۱
						۱۶	۰/۵۴	۴/۱

ادامه جدول ۱.

شماره خانواده	کد مولدین	جنسیت مولدین	سن مولدین(سال)	وزن کل مولدین (گرم)	طول کل مولدین (سانتی‌متر)	کد نتاج	وزن کل نتاج (گرم)	طول کل نتاج (سانتی‌متر)
دو	۷	ماده	۶	۱۰۹۰	۵۱	۸	۰/۱۸	۳/۰
						۹	۰/۹۴	۴/۸
						۱۰	۰/۳۲	۳/۵
						۱۱	۰/۹۱	۴/۹
						۱۲	۲/۴۱	۶/۸
						۱۳	۳/۱۲	۷/۴
	۲۴	نر	۶	۷۸۰	۴۴	۱۴	۰/۶۴	۴/۳
						۱۵	۰/۲	۳/۱
						۱۶	۰/۵۴	۴/۱
هشت	۲۸	ماده	۴	۵۴۰	۴۱	۲۳	۱/۳۶	۵/۶
						۲۵	۰/۵۵	۴/۰
						۲۶	۱/۰۲	۵/۰
	۲۶	نر	۴	۴۴۵	۳۹	۲۷	۱/۱۳	۵/۲
						۲۸	۰/۳۵	۳/۶
						۲۹	۰/۷	۴/۵
پنج	۶	ماده	۴	۱۲۱۵	۵۱	۷۱	۰/۲۱	۳/۱
						۷۳	۰/۴۲	۳/۶
						۷۴	۰/۱۳	۲/۸
	۱۰	نر	۴	۷۵۵	۴۴	۷۵	۰/۲۷	۳/۲
						۷۶	۰/۵	۴/۰
هفت	۱۵	ماده	۵	۱۱۹۵	۵۲	۳۶	۰/۷۳	۴/۷
						۳۷	۰/۶۳	۴/۴
						۳۸	۰/۳۶	۳/۵
						۳۹	۰/۰۶	۲/۲
						۴۰	۰/۱۷	۲/۸
						۴۱	۰/۵۳	۴/۱
	۲۲	نر	۵	۷۶۰	۴۴/۵	۴۲	۰/۳۲	۳/۵
						۴۳	۰/۱۴	۲/۸
						۴۴	۰/۹۱	۴/۹
						۴۵	۰/۳۹	۳/۸
						۴۶	۰/۴۶	۳/۸
						۴۷	۰/۸۸	۴/۸
دَه	۳۴	ماده	۴	۸۱۰	۴۵	۴۸	۰/۲۹	۳/۵
						۴۹	۰/۴۱	۳/۹
						۵۰	۰/۱۲	۲/۸
						۵۱	۰/۲۱	۳/۳
						۵۲	۰/۹	۵/۰
	۳۶	نر	۴	۶۵۰	۴۰/۵	۵۳	۱/۲۱	۵/۶
						۵۴	۰/۵۷	۴/۵
						۵۵	۰/۶۱	۴/۵
						۵۶	۱/۴۳	۶/۰

۲.۲. انتخاب نشانگرهای ریزماهواره

چهار نشانگر ریزماهواره مرتبط با صفات رشد(طول کل و وزن بدن) متعلق به گونه کپور معمولی شامل HLJ3988 مرتبط با وزن لاشه، طول کل و ضخامت لاشه(پلیوتروپ)، HLJ3366 مرتبط با طول لاشه (QTL بزرگ‌اثر)، HLJ2316 مرتبط با وزن لاشه و HLJ2225 مرتبط با وزن و طول لاشه(پلیوتروپ) از مقالات انتخاب و پرایمر مربوط به آن‌ها از داده‌های مقاله Ji *et al.*, 2012 استخراج شد (جدول ۲).

جدول ۲- مشخصات نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با صفات رشد در کپور معمولی(*C. carpio*) (F: پرایمر پیشرو ، R: پرایمر پسرو)

نام نشانگر ریزماهواره	شماره ثبت در داده‌پایگاه NCBI	صفت	اندازه توالی تکثیریافته (جفت باز)	گروه اتصال	توالی پرایمر (3′→ 5′)	دمای اتصال پرایمر	منبع
HLJ3988 (پلیوتروپ)	JN687146	وزن لاشه ضخامت بدن طول کل	۴۰۰	LG24	F TCTCCCCACACACATACACG R CTGTCGCTCTTATTTCACAAGG	۵۹/۳۵ ۵۸/۳۹	(Lv et. al., 2016)
HLJ3366 QTL) بزرگ‌اثر)	JN686990	طول لاشه	۳۶۳	LG39	F CCAATATGCAAGAATAAGCAAA RCCTCTTAAATTTATCCTCTTCAACAAA	۵۲/۸۰ ۵۷/۳۷	(Laghari et. al., 2015)
HLJ2225 (پلیوتروپ)	JN686840	وزن لاشه طول لاشه	۱۶۴	LG29	F ACGGAGGGACGGTAATCCTA R CCCCATTGTAAAGCCAGCAT	۵۹/۳۵ ۵۷/۳۰	(Laghari et. al., 2015)
HLJ2316	JN686850	وزن لاشه	۴۵۲	LG17	F CGTCAGCACAAGAGCAAAAG R CAGCGTAGCGAGTCAGAACA	۵۷/۳۰ ۵۹/۳۵	(Laghari et. al., 2015)

۲.۳. PCR و نمره‌دهی باندها

حجم واکنش PCR(۲۰ میکرولیتر) شامل: ۱۰ میکرولیتر Taq DNA Polymerase 2 x Mastermix Red شرکت تجاری پیشگام(غلظت نهایی: Taq: 0.4 U/µ، dNTPs: 0.2 mM، MgCl2: 1.5 mM)، ۱/۵میکرومول پرایمر Forward، ۱/۵ میکرومول پرایمر Backward، ۲۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA و ۵ میکرولیتر آب مقطر بود. PCR نمونه‌ها با استفاده از دستورالعمل زیر برای ماهی سفید بهینه‌سازی و اجرا شد: واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ چرخه، واسرشت‌سازی ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، Ramp تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمر در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، توسعه اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه و توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه. به‌منظور اطمینان از تکثیر پرایمرها الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱٪(حاوی یک میکرولیتر DNA green viewer® به‌ازای هر دَه میلی‌لیتر ژل آگارز مصرفی) اجرا و نتایج با Geldoc بررسی شدند. سپس محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید(PAGE) ۸٪ با ولتاژ ۲۵۰ ولت به مدت چهار ساعت جهت تفکیک بهتر باندها اجرا شدند. از چهار نشانگر ریزماهواره به‌کاررفته، در مجموع ۱۰ لوکوس(شامل سه لوکوس دو اللی(HL1، HL2 و HL6) و هفت لوکوس تک اللی(HL3، HL4، HL5، HL6، HL7، HL8، HL9 و HL10) توسط نرم‌افزار AlphaEaseFC انتخاب و نمره‌دهی شدند. لوکوس‌های HL1، HL2 و HL3 از تکثیر پرایمرهای نشانگر ریزماهواره HLJ2225، لوکوس‌های HL4 و HL5 از تکثیر پرایمرهای ماکر ریزماهواره HLJ3366، لوکوس‌های HL6، HL7 و HL8 از تکثیر پرایمرهای نشانگر ریزماهواره HLJ3988 و لوکوس‌های

HL9 و HL10 از تکثیر پرایمرهای نشانگر ریزماهواره HLJ2316 به‌دست آمدند (جدول ۳). آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Arlequin Ver. 3.5، GenAlEx 6.1 و Excel 2013 انجام شد.

جدول ۳- دامنه اندازه هر لوکوس برحسب جفت‌باز(bp)

نام نشانگر	نام لوکوس تکثیریافته	دامنه اندازه(جفت‌باز)
HLJ2225	HL1	۲۵۷-۲۳۶
	HL2	۱۵۵-۱۴۱
	HL3	۱۳۴-۱۲۵
HLJ3366	HL4	۲۶۴-۲۳۹
	HL5	۱۸۰-۱۶۲
HLJ3988	HL6	۳۶۰-۳۲۷
	HL7	۲۴۸-۲۳۵
	HL8	۱۳۷-۱۲۸
HLJ2316	HL9	۲۹۱-۲۷۴
	HL10	۲۲۵-۲۰۵

۳. نتایج

۳.۱. فراوانی‌های اللی، پلی‌مورفیسم و وراثت‌پذیری

تعداد الل‌های هر لوکوس(N_A)، تعداد الل‌های مؤثر هر لوکوس(N_E)، شاخص تثبیت(F)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار(H_E) و هتروزیگوسیتی مشاهده شده(H_o) توسط نرم‌افزار GenAlEx 6.1 محاسبه شدند (جدول ۴). همان‌طوری‌که در جدول ۴ مشاهده می‌شود تعداد الل‌های مشاهده‌شده(N_A) و تعداد الل‌های مؤثر(N_E) در جمعیت نتاج نسبت به جمعیت مولدین افزایش نشان داد. هتروزیگوسیتی مورد انتظار(H_E) در هر دوی جمعیت مولدین و نتاج نسبت به هتروزیگوسیتی مشاهده شده(H_o) بالاتر بود به‌جز در مورد HL1 و HL2 که H_o بالاتر از H_E بود. شاخص تثبیت(F) در لوکوس‌های HL3، HL4، HL5، HL7، HL8، HL9 و HL10 در هر دوی جمعیت مولدین و فرزندان برابر با یک بود که به معنی وجود هوموزیگوسیتی بالا در این لوکوس‌ها است. مقدار منفی F در لوکوس‌های HL1، HL2 و هم‌چنین کوچک‌بودن مقدار آن در لوکوس HL6 در هر دو جمعیت مولدین و فرزندان نشان‌دهنده وجود هتروزیگوسیتی در این لوکوس‌ها است به‌طوری‌که افزایش شاخص تثبیت(F) در لوکوس های HL1 و HL2 و کاهش آن در HL6 در جمعیت نتاج نسبت به جمعیت مولدین به‌ترتیب نشان‌دهنده افزایش و کاهش هتروزیگوسیتی این لوکوس‌ها در جمعیت نتاج نسبت به جمعیت مولدین است. از آن‌جایی‌که نرم‌افزار GenAlEx 6.1 درصد پلی‌مورفیسم کل لوکوس‌ها را صددرصد نشان داد و برای هر لوکوس PIC جداگانه‌ای ارائه نداد در جدول ۴. PIC جمعیت مولدین و جمعیت نتاج با استفاده از تعداد الل‌های مشاهده‌شده در هر لوکوس (N_A) طبق فرمول زیر محاسبه شده است:

Freq. (فراوانی اللی): تعداد الل های واقعی که در جمعیت یافت‌شده (N_A) تقسیم بر تعداد کل افراد

$$PIC = 1 - Freq.^2$$

به‌جز در مورد HL10 که PIC نتاج اندکی از PIC والدین کمتر بود، جمعیت نتاج در سایر لوکوس‌ها PIC بالاتری نسبت به جمعیت والدین نشان داد.

جدول ۴- تعداد الل‌های مشاهده‌شده (N_A)، تعداد الل‌های مؤثر(N_E)، هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده (H_o)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار(H_E)، شاخص تثبیت(F) و PIC در هر یک از لوکوس‌های HL1، HL2، HL3، HL4، HL5، HL6، HL7، HL8، HL9 و HL10 در مولدین (۲۲ نمونه) و نتاج(۷۵ نمونه) ماهی سفید

	مولدین								نتاج							
نام لوکوس‌ها	N_A	N_E	H_O	H_E	F	PIC	N_A	N_E	H_O	H_E	F	PIC
HL1	۱۷/۰۰	۱۱/۸۰۵	۱/۰۰۰	۰/۹۱۵	− ۰/۰۹۳	۰/۴۱	۱۸/۰۰	۱۳/۴۸۹	۱/۰۰۰	۰/۹۲۶	− ۰/۰۸۰	۰/۹۵
HL2	۱۳/۰۰	۸/۴۹۱	۱/۰۰۰	۰/۸۸۲	− ۰/۱۳۳	۰/۶۶	۱۴/۰۰	۱۰/۴۲۶	۰/۹۹۳	۰/۹۰۴	− ۰/۰۳۲	۰/۹۷
HL3	۸/۰۰	۵/۰۴۲	۰/۰۰۰	۰/۸۰۲	۱/۰۰۰	۰/۸۸	۱۰/۰۰	۶/۳۵۶	۰/۰۰۰	۰/۸۴۳	۱/۰۰۰	۰/۹۹
HL4	۸/۰۰	۵/۵۰۰	۰/۰۰۰	۰/۸۱۸	۱/۰۰۰	۰/۸۸	۲۲/۰۰	۱۲/۹۳۱	۰/۰۰۰	۰/۹۲۳	۱/۰۰۰	۰/۹۲
HL5	۶/۰۰	۳/۵۵۹	۰/۰۰۰	۰/۷۱۹	۱/۰۰۰	۰/۹۳	۱۷/۰۰	۷/۶۷۴	۰/۰۰۰	۰/۸۷۰	۱/۰۰۰	۰/۹۶
HL6	۱۴/۰۰	۹/۰۰۰	۰/۳۸۱	۰/۸۸۹	۰/۵۷۱	۰/۶۱	۲۹/۰۰	۱۸/۳۷۶	۰/۴۷۳	۰/۹۴۶	۰/۵۰۰	۰/۸۶
HL7	۱۰/۰۰	۴/۷۴۵	۰/۰۰۰	۰/۷۸۹	۱/۰۰۰	۰/۸۰	۱۱/۰۰	۶/۰۵۸	۰/۰۰۰	۰/۸۳۵	۱/۰۰۰	۰/۹۹
HL8	۶/۰۰	۳/۳۱۵	۰/۰۰۰	۰/۶۹۸	۱/۰۰۰	۰/۹۳	۹/۰۰	۵/۰۳۳	۰/۰۰۰	۰/۸۰۱	۱/۰۰۰	۰/۹۹
HL9	۶/۰۰	۵/۱۴۹	۰/۰۰۰	۰/۸۰۶	۱/۰۰۰	۰/۹۳	۱۶/۰۰	۱۰/۰۹۹	۰/۰۰۰	۰/۹۰۱	۱/۰۰۰	۰/۹۶
HL10	۴/۰۰	۳/۷۲۳	۰/۰۰۰	۰/۷۳۱	۱/۰۰۰	۰/۹۷	۱۷/۰۰	۹/۸۵۱	۰/۰۰۰	۰/۸۹۸	۱/۰۰۰	۰/۹۶

تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx 6.1 بررسی شد. نتایج آزمون کای-اسکور در جدول ۵ نشان می‌دهد که همه لوکوس‌ها در هر دوی جمعیت والدین و نتاج در تعادل هاردی- واینبرگ نیستند. افزایش معنی‌داری لوکوس‌های HL1 و HL2 از ۰/۰۵ در جمعیت والدین به ۰/۰۰۱ در جمعیت نتاج نشان‌دهنده افزایش عدم تعادل این دو لوکوس در جمعیت نتاج نسبت به والدین است. نتایج آزمون کای-اسکور سایر لوکوس‌ها در هر دوی جمعیت مولدین و نتاج در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار شدند.

جدول ۵- خلاصه آزمون کای-اسکور برای تعادل هاردی-واینبرگ لوکوس‌های ریزماهواره در مولدین(۲۲ نمونه) و نتاج(۷۵ نمونه) ماهی سفید.
کلید: ns = عدم معنی‌داری، $P < ۰/۰۵$ *، $P < ۰/۰۱$ **، $P < ۰/۰۰۱$ ***

	مولدین				نتاج			
نام لوکوس	DF	Chisq.	Prob.	Signif.	DF	Chisq.	Prob.	Signif.
HL1	۱۳۶	۱۷۸/۰۸۳	۰/۰۱۳	*	۱۵۳	۲۸۸/۱۷۱	۰/۰۰۰	***
HL2	۷۸	۱۰۰/۳۹۷	۰/۰۴۵	*	۹۱	۲۰۲/۷۳۴	۰/۰۰۰	***
HL3	۲۸	۱۵۴/۰۰۰	۰/۰۰۰	***	۴۵	۶۷۵/۰۰۰	۰/۰۰۰	***
HL4	۲۸	۱۵۴/۰۰۰	۰/۰۰۰	***	۲۳۱	۱۵۷۵/۰۰۰	۰/۰۰۰	***
HL5	۱۵	۱۱۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	***	۱۳۶	۱۲۰۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	***
HL6	۹۱	۱۷۳/۸۸۰	۰/۰۰۰	***	۴۰۶	۱۰۶۵/۳۷۶	۰/۰۰۰	***
HL7	۴۵	۱۹۸/۰۰۰	۰/۰۰۰	***	۵۵	۷۴۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	***
HL8	۱۵	۱۱۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	***	۳۶	۵۹۲/۰۰۰	۰/۰۰۰	***
HL9	۱۵	۱۱۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	***	۱۲۰	۱۱۲۵/۰۰۰	۰/۰۰۰	***
HL10	۶	۶۶/۰۰۰	۰/۰۰۰	***	۱۳۶	۱۲۰۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	***

DF: درجه آزادی، .Chisq : کای-اسکور، .Prob : احتمال، .Signif : معنی‌داری

R_{st} و F_{st} هر لوکوس در کل جمعیت مولدین و نتاج توسط نرم‌افزار GenAlEx 6.1 محاسبه شد(جدول ۶). این

دو آماره با استفاده از آنالیز واریانس محاسبه شدند. همان‌طوری‌که در جدول ۶. مشاهده می‌شود R_{st} کل از F_{st} کل بیشتر است. ضریب همبستگی پیرسون و رگرسیون بین صفات طول کل و وزن کل با استفاده از نرم‌افزار اکسل محاسبه شدند. ضریب همبستگی بین طول کل و وزن کل ۰/۹۶ بود. آزمون معنی‌داری ضریب همبستگی نشان داد که بین طول کل و وزن کل همبستگی معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود دارد. برای بررسی نوع رابطه بین طول کل و وزن کل از رگرسیون استفاده شد. ضریب تشخیص رابطه رگرسیون برابر با ۰/۹۳ بود. بنابراین ۹۳ درصد از تغییرات وزن کل (متغیر وابسته: Y) به‌واسطه طول کل (متغیر مستقل: X) خواهد بود. با توجه به اینکه مقدار significance F وار یانس رگرسیون از ۰/۰۱ کوچک‌تر شد بنابراین رابطه خطی مثبتی بین طول و وزن وجود دارد. ضریب عرض از مبدأ معنی‌دار نشد. بنابراین استفاده از رابطه رگرسیون خطی، نمودارهای مربوط به رگرسیون و همچنین محاسبه CV به زمانی موکول می شود که نتاج به بلوغ رسیده با شند به‌طوری‌که اختلاف طول و وزنشان با مولدین اندک باشد. وراثت‌پذیری هر لوکوس توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$h^2=\frac{V_G}{V_P}$$

که h^2 وراثت‌پذیری، V_G واریانس ژنوتیپی کل جمعیت مولدین و نتاج و V_P واریانس فنوتیپی کل جمعیت مولدین و نتاج هستند. وراثت‌پذیری تک‌تک لوکوس‌ها برای صفات وزن و طول کل در جدول ۵. ارائه شده است. همه لوکوس‌ها وراثت‌پذیری پایینی برای صفات مرتبط با رشد (طول کل و وزن) نشان دادند.

جدول ۶- آماره‌های R و F (R_{st} و F_{st}) و وراثت‌پذیری هر لوکوس برای صفات رشد(وزن و طول) در کل جمعیت مولدین (۲۲ نمونه) و نتاج (۷۵ نمونه) ماهی سفید (تعداد کل:۹۷ = ۷۵ + ۲۲). لوکوس‌ها شامل HL1، HL2، HL3، HL4، HL5، HL6، HL7، HL8، HL9 و HL10 هستند.

لوکوس‌ها	R_{st}	F_{st}	وراثت‌پذیری هر لوکوس برای وزن کل	وراثت‌پذیری هر لوکوس برای طول کل
HL1	- ۰/۰۱۵	۰/۰۰۳	$۱/۶۵ \times ۱۰^{-۴}$	۰/۰۶۸
HL2	۰/۰۳۳	۰/۰۰۴	$۶/۵۹ \times ۱۰^{-۵}$	۰/۰۲۷
HL3	۰/۰۶۰	۰/۰۴۰	$۳/۶ \times ۱۰^{-۵}$	۰/۰۱۵
HL4	۰/۲۰۷	۰/۰۲۵	$۲/۹۴ \times ۱۰^{-۴}$	۰/۱۲۲
HL5	۰/۲۶۷	۰/۰۸۵	$۱/۴۵ \times ۱۰^{-۴}$	۰/۰۶۰
HL6	۰/۰۲۲	۰/۰۳۳	$۳/۱۶ \times ۱۰^{-۴}$	۰/۱۳۱
HL7	۰/۰۲۷۰	۰/۰۶۸	$۴/۲۳ \times ۱۰^{-۵}$	۰/۰۱۷
HL8	۰/۲۳۲	۰/۱۰۰	$۲/۹۶ \times ۱۰^{-۵}$	۰/۰۱۲
HL9	۰/۰۰۴	۰/۰۴۱	$۸/۲۲ \times ۱۰^{-۵}$	۰/۰۳۴
HL10	۰/۰۳۷	۰/۰۸۷	$۹/۹۹ \times ۱۰^{-۵}$	۰/۰۴۱
مجموع	۰/۱۰۳	۰/۰۴۸	-----	-----

۳.۲. عدم تعادل پیوستگی(LD) و تعیین گروه‌های اتصال

آزمون عدم تعادل پیوستگی جفتی برای هر دو جمعیت مولدین و جمعیت نتاج توسط نرم‌افزار Arlequin ver. 3.5 در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ اجرا شد (جدول‌های ۷ و ۸). همان‌طوری‌که در جدول ۷ مشاهده می‌شود در جمعیت مولدین، HL1 با هیچ یک از لوکوس های دیگر LD مثبت نشان نداد درحالی‌که HL1 در جمعیت نتاج (جدول ۸) LD مثبتی با HL2، HL3 و HL5 نشان داد. در جمعیت مولدین، HL2 فقط با لوکوس HL3، LD مثبت نشان داد درحالی‌که HL2 در جمعیت نتاج علاوه بر نشان‌دادن LD مثبت با لوکوس فوق‌الذکر با HL1، HL5، HL6، HL7، HL9 و HL10 نیز LD مثبت نشان داد.

جدول ۷- عدم تعادل پیوستگی(LD) در جمعیت مولدین(۲۲ نمونه) ماهی سفید(P value = 0/05)

لوکوس#	HL1	HL2	HL3	HL4	HL5	HL6	HL7	HL8	HL9	HL10
HL1	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–
HL2	–	*	+	–	–	–	–	–	–	–
HL3	–	+	*	+	+	+	+	+	+	+
HL4	–	–	+	*	+	+	+	+	+	+
HL5	–	–	+	+	*	+	+	+	+	+
HL6	–	–	+	+	+	*	+	+	+	+
HL7	–	–	+	+	+	+	*	+	+	+
HL8	–	–	+	+	+	+	+	*	+	+
HL9	–	–	+	+	+	+	+	+	*	+
HL10	–	–	+	+	+	+	+	+	+	*

جدول ۸- عدم تعادل پیوستگی(LD) در جمعیت نتاج(۷۵ نمونه) ماهی سفید(P value = 0/05)

لوکوس#	HL1	HL2	HL3	HL4	HL5	HL6	HL7	HL8	HL9	HL10
HL1	*	+	+	–	+	–	–	–	–	–
HL2	+	*	+	–	+	+	+	–	+	+
HL3	+	+	*	+	+	+	+	+	+	+
HL4	–	–	+	*	+	+	+	+	+	+
HL5	+	+	+	+	*	+	+	+	+	+
HL6	–	+	+	+	+	*	+	+	+	+
HL7	–	+	+	+	+	+	*	+	+	+
HL8	–	–	+	+	+	+	+	*	+	+
HL9	–	+	+	+	+	+	+	+	*	+
HL10	–	+	+	+	+	+	+	+	+	*

با توجه به نتایج LD در جمعیت نتاج (جدول ۸. را ببینید) پنج گروه اتصال(LG) به‌شرح ذیل تعیین شد:

LG1: HL1- HL2- HL3- HL5

LG2: HL2- HL1- HL3- HL5- HL6- HL7- HL9- HL10

LG3: HL3- HL1- HL2- HL4-HL5- HL6- HL7- HL8- HL9-HL10

LG4: HL4- HL3- HL5- HL6- HL7- HL8- HL9- HL10

LG5: HL6- HL2- HL3- HL4- HL5- HL7- HL8- HL9- HL10

در جدول ۹ وراثت‌پذیری گروه‌های تعیین شده برای هر یک از صفات وزن و طول آورده شده است. همان‌طوری‌که در جدول ۹ مشاهده می‌شود LG1 با چهار لوکوس و LG3 با ده لوکوس به‌ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین وراثت‌پذیری را برای صفت طول کل نشان داده‌اند. با توجه به این‌که همه گروه‌های اتصال به‌دست‌آمده (LG1، LG2، LG3، LG4 و LG5) وراثت‌پذیری بسیار ناچیزی برای صفت وزن کل نشان دادند در ادامه، از در نظرگرفتن وراثت پذیری گروه‌های اتصال برای صفت وزن کل صرف‌نظر شد. از طرف دیگر، ازآن‌جایی که وضعیت عدم تعادل پیوستگی (LD) لوکوس های HL1 و HL2 در جمعیت مولدین و نتاج متفاوت بود، گروه‌های اتصال (LG) شامل هر دو لوکوس HL1 و HL2 کنار گذاشته شدند. گروه‌های اتصال LG1، LG2، LG3 و LG5 دارای لوکوس‌های HL1 و HL2 بودند. بنابراین فقط گروه اتصال LG4 برای ادامه آنالیزها به‌کار برده‌شد. همچنین LG4 در هر دو جمعیت مولدین و نتاج مشابه بود. با در نظرگرفتن میزان وراثت‌پذیری بین صفر و یک و با توجه به جدول ۸. وراثت‌پذیری LG4 (h^2=۰/۴۳۲) برای صفت طول کل نسبتاً متوسط بود.

جدول ۹- وراثت‌پذیری گروه‌های اتصال(LGs) برای صفات رشد(وزن و طول کل) در کل جمعیت مولدین و نتاج ماهی سفید(تعداد کل: ۹۷ = ۷۵ + ۲۲)

گروه اتصال	تعداد لوکوس‌های گروه اتصال	وراثت‌پذیری گروه اتصال برای وزن کل	وراثت‌پذیری گروه اتصال برای طول کل
LG1	۴	$۴/۱۱۹ \times ۱۰^{-۴}$	۰/۱۷
LG2	۸	$۹/۵۲۳ \times ۱۰^{-۴}$	۰/۳۹۳
LG3	۱۰	$۱/۲۷۵۹ \times ۱۰^{-۳}$	۰/۵۲۷
LG4	۸	$۱/۰۴۵ \times ۱۰^{-۳}$	۰/۴۳۲
LG5	۹	$۱/۱۱۰۹ \times ۱۰^{-۳}$	۰/۴۵۹

LG1 شامل لوکوس‌های: HL1، HL2، HL3 و HL5 است. LG2 شامل لوکوس‌های: HL2، HL1، HL3،HL5، HL6، HL7، HL9 و HL10 است. LG3 شامل لوکوس‌های: HL3، HL1، HL2، HL4، HL5، HL6، HL7، HL8، HL9 و HL10 است. LG4 شامل لوکوس‌های: HL4، HL3، HL5، HL6، HL7، HL8، HL9 و HL10 است. LG5 شامل لوکوس‌های: HL6، HL2، HL3، HL4، HL5، HL7، HL8، HL9 و HL10 است.

۳،۳. گزینش بر مبنای گروه اتصال (LGS)

همان‌طوری‌که قبلاً ذکر شد در این تحقیق تعداد ۱۱ خانواده خویشاوند تنی به‌دست آمد. به‌منظور انتخاب خانواده‌های مناسب ماهی سفید برای شروع برنامه اصلاح نژادی با استفاده از گروه اتصال تعیین‌شده در این تحقیق(LG4)، از هر خانواده سه نمونه بچه‌ماهی براساس طول کل با استفاده از نرم‌افزار اکسل به‌طور تصادفی انتخاب شدند. علت انتخاب بچه‌ماهیان براساس طول کل این بود که وراثت‌پذیری گروه اتصال تعیین شده (LG4) مربوط به صفت طول کل بوده است. پس از انتخاب تصادفی بچه‌ماهیان مربوط به هر خانواده، در ابتدا با استفاده از نرم‌افزار اکسل واریانس ژنتیکی هر بچه‌ماهی براساس گروه اتصال LG4 به‌صورت جداگانه محاسبه و سپس از مجموع واریانس ژنتیکی نتاج هر خانواده میانگین گرفته شد(جدول ۱۰). از آن‌جایی که مولدین به‌کاررفته در این تحقیق از طبیعت گرفته شده بودند و بنابراین منشأ مشخصی نداشتند داده‌های میانگین واریانس ژنتیکی در نظر گرفته نشد. همچنین از ذکر طول کل، وزن کل و سن مولدین در جدول صرف نظر شد. در جدول ۱۰. خانواده‌ها براساس میانگین طول کل نتاج هر خانواده در سه گروه(گروه‌های اول، دوم و سوم) گروه‌بندی شدند. بررسی واریانس ژنتیکی تک‌تک نتاج هر خانواده براساس LG4 نشان داد که فقط طول و وزن تک‌تک فرزندان خانواده‌های شماره سه، چهار، پنج و شش با افزایش و کاهش واریانس ژنتیکی به‌ترتیب افزایش و کاهش یافتند (جدول ۱۱). در جدول ۱۱. به‌منظور خلاصه‌سازی جدول، فقط داده‌های خانواده‌های شماره سه، چهار، پنج و شش ذکر شده‌اند و داده‌های خانواده شماره هشت به‌عنوان نمونه‌ای از خانواده‌های

ذکرنشده آورده شده‌است.

جدول ۱۰- میانگین واریانس ژنتیکی نتاج ماهی سفید بر اساس LG4 شامل لوکوس‌های HL3، HL4، HL5، HL6، HL7، HL8، HL9 و HL10

شماره گروه‌ها بر اساس طول کل	شماره خانواده	تعداد نتاج انتخاب‌شده به‌صورت تصادفی	میانگین واریانس ژنتیکی	میانگین طول کل (سانتی‌متر)	میانگین وزن کل (گرم)
گروه اول	شش	۳	۵۴۶۸/۶۸	۵/۲۶	۱/۱۶
	یازده	۳	۵۲۵۷/۴۷	۵/۱۳	۱/۰۵
	هشت	۳	۵۱۶۱/۴	۵/۱	۱/۰۶
گروه دوم	سه	۳	۵۲۸۲/۰۸	۴/۷۶	۰/۸۹۶
	دو	۳	۵۲۵۵/۵۹	۴/۶۶	۰/۸۳
	چهار	۳	۵۱۲۰/۷۶	۴/۶۳	۰/۸۹۳
	یک	۳	۵۲۱۰/۸۲	۴/۶۳	۰/۸
	نه	۳	۵۲۳۰/۵۲	۴/۱۶	۰/۴۶
	ده	۳	۵۰۴۱/۳۷	۴/۱	۰/۶۱
گروه سوم	هفت	۳	۵۰۲۳/۸۳	۳/۴۶	۰/۳۶
	پنج	۳	۵۴۵۹/۵۹	۳/۳	۰/۳

جدول ۱۱- بررسی تغییرات طول و وزن نتاج خانواده‌ها براساس واریانس ژنتیکی هر فرد

(از هر خانواده سه فرد به‌صورت تصادفی انتخاب شده‌است. * افزایش طول و وزن افراد خانواده با افزایش واریانس ژنتیکی.)

شماره خانواده	واریانس ژنتیکی تک‌تک فرزندان	طول کل(سانتی‌متر)	وزن کل(گرم)
سه*	۵۳۲۵/۱۳	۵/۹	۱/۶۴
	۵۳۰۳/۹۳	۴/۴	۰/۶
	۵۲۱۷/۱۸	۴	۰/۴۵
چهار*	۵۱۳۹/۹۸	۵/۹	۱/۶۴
	۵۱۲۹/۸	۴/۸	۰/۸۴
	۵۰۹۲/۵۱	۳/۲	۰/۲
پنج*	۵۵۷۸/۶۶	۳/۶	۰/۴۲
	۵۵۱۹/۴	۳/۲	۰/۲۷
	۵۲۸۰/۷۳	۳/۱	۰/۲۱
شش*	۵۵۱۹/۵۸	۶/۵	۱/۹۴
	۵۵۰۱/۵۲	۵/۶	۱/۱۹
	۵۳۸۴/۹۶	۳/۷	۰/۳۵
هشت	۵۱۲۰/۳۸	۵/۶	۱/۳۶
	۵۲۱۸/۱۳	۵/۲	۱/۱۳
	۵۱۴۵/۷۱	۴/۵	۰/۷
یازده	۵۳۷۶/۴۶	۴/۶	۰/۶۷
	۵۳۲۳/۴۶	۴/۷	۰/۷۷
	۵۰۷۲/۵۱	۶/۱	۱/۷۲
یک	۵۴۰۶/۴۲	۵/۸	۱/۲۹
	۵۴۳۴/۰۶	۳/۱	۰/۲
	۴۷۹۱/۹۸	۵/۰	۰/۹۳

ادامه جدول ۱۱.

شماره خانواده	واریانس ژنتیکی تک‌تک فرزندان	طول کل(سانتی‌متر)	وزن کل(گرم)
دو	۵۴۰۶/۹۶	۴/۸	۰/۹۴
	۵۰۶۲/۴	۴/۹	۰/۹۱
	۵۲۹۷/۴۲	۴/۳	۰/۶۴
هفت	۴۸۹۰/۴	۴/۴	۰/۶۳
	۴۹۰۴/۲۵	۲/۲	۰/۰۶
	۵۲۷۶/۸۶	۳/۸	۰/۳۹
نُه	۵۲۵۹/۹۸	۴/۳	۰/۵
	۵۲۷۱/۶۶	۳/۹	۰/۳۵
	۵۱۵۹/۹۳	۴/۳	۰/۵۳
دَه	۵۲۰۳/۴۹	۳/۵	۰/۲۹
	۴۸۴۶/۶۵	۲/۸	۰/۱۲
	۵۰۷۳/۹۸	۶/۰	۱/۴۳

۴. بحث و نتیجه گیری

نقشه‌های اتصال ایجاد شده از نشانگرهای پلی‌مورفیک مختص گونه یکی از ابزارهای ژنتیکی ضروری جهت اجرای تحقیقات جامع برای لوکوس‌های تأثیرگذار بر فنوتیپ(های) مورد نظر است به‌خصوص آن‌هایی که به صفات مهم تجاری متصل هستند (Chistiakov *et al.*, 2005). در این مطالعه با کاربرد نشانگرهای ریزماهواره کپور معمولی در ماهی سفید لوکوس های مختص ماهی سفید(شامل لوکوس‌های HL1، HL2، HL3، HL4، HL5، HL6، HL7، HL8، HL9 و HL10) تولید شد. ابتدا قابلیت کاربرد لوکوس‌های به‌دست‌آمده در برنامه اصلاح نژاد ماهی سفید بررسی شد: افزایش تعداد الل‌های واقعی مشاهده‌شده(N_A) و تعداد الل های مؤثر(N_E) همه لوکوس ها در جمعیت نتاج نسبت به جمعیت مولدین نشان‌دهنده افزایش پلی‌مورفیسم در جمعیت نتاج است. همان‌طوری‌که در جدول ۴. مشاهده می‌شود PIC نتاج نسبت به PIC والدین افزایش یافته است. براساس Hardy و همکاران (۲۰۰۳) انتظار می‌رود تحت هم‌بخشی جهش‌های گام-مانند، R_{st} از F_{st} بزرگتر باشد. بنابراین با توجه به بالاتربودن R_{st} کل از F_{st} کل (جدول ۶) می‌توان علت افزایش میزان پلی‌مورفیسم نتاج نسبت به مولدین را به جهش نسبت داد. هتروزیگوسیتی‌های مورد انتظار (H_E) لوکوس‌های HL3، HL4، HL5، HL7، HL8، HL9 و HL10 در هر دوی جمعیت مولدین و نتاج نسبت به هتروزیگو سیتی‌های مشاهده شده (H_o) بالاتر بود. به‌علت صفر بودن هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده (H_o) در لوکوس‌های فوق‌الذکر نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_E) شاخص تثبیت (F) یک شد که نشان‌دهنده هوموزیگوسیتی بالای این لوکوس‌ها و احتمالاً به‌خاطر تک‌اللی بودن آن‌ها است. بالاتربودن هتروزیگو سیتی‌های مشاهده شده(H_o) در لوکوس‌های HL1 و HL2 نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_E) این لوکوس‌ها در هر دوی جمعیت مولدین و نتاج نشان‌دهنده هتروزیگو سیتی بالای این دو لوکوس است به‌طوری‌که مقدار منفی شاخص تثبیت (F) این ادعا را تأیید می‌کند. هم‌چنین با افزایش هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_E) این دو لوکوس (HL1 و HL2) در جمعیت نتاج، شاخص تثبیت افزایش نشان داد و در نتیجه هتروزیگوسیتی لوکوس‌های HL1 و HL2 در جمعیت نتاج نسبت به جمعیت مولدین بالاتر بود. کاهش جزئی شاخص تثبیت (F) لوکوس HL6 در نتاج نسبت به

جمعیت مولدین نشان‌دهنده کاهش هتروزیگوسیتی این لوکوس در جمعیت نتاج بود. آزمون تعادل هاردی – واینبرگ نشان داد که همه لوکوس‌ها (HL1، HL2، HL3، HL4، HL5، HL6، HL7، HL8، HL9 و HL10) در هر دوی جمعیت مولدین و نتاج از قانون هاردی-واینبرگ تبعیت نکردند. با توجه به موارد ذکرشده نتیجه گرفته می‌شود که لوکوس‌های فوق‌الذکر برای کاربرد در برنامه به‌گزینی ماهی سفید به‌کمک نشانگر مناسب هستند. همچنین نشانگرهای ریزماهواره کپور معمولی قابلیت کاربرد در ماهی سفید را دارند به‌طوری‌که در این تحقیق لوکوس‌های مختص ماهی سفید تولید شد. همان‌طوری‌که در جدول‌های ۷. و ۸. مشاهده می شود HL1 در جمعیت والدین هیچ LD مثبتی با سایر لوکوس‌ها نشان نداد ولی در جمعیت نتاج با سه لوکوس HL2، HL3 و HL5 عدم تعادل پیوستگی مثبتی نشان داد. لوکوس HL2 در مولدین فقط با HL3 عدم تعادل پیوستگی مثبت نشان داد در حالی‌که HL2 در نتاج LD مثبتی با HL1، HL3، HL5، HL6، HL7، HL9 و HL10 نشان داد. از آن‌جایی‌که نرم‌افزار آرلکوین LD را بر مبنای انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ و با استفاده از آزمون کای-اسکور محاسبه می‌کند این افزایش LD مثبت لوکوس‌های HL1 و HL2 در جمعیت نتاج را می‌توان به افزایش انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ این دو لوکوس در نتاج نسبت داد. هم‌چنان‌که در جدول ۵. مشاهده می‌شود معنی‌داری انحراف از تعادل در لوکوس‌های HL1 و HL2 از ۰/۰۵ در جمعیت مولدین به ۰/۰۰۱ در جمعیت نتاج افزایش یافته است.

از طرف دیگر، ترکیب دو رویکرد LD و LA در یک آنالیز منفرد به‌عنوان LDLA شناخته می‌شود که از نظر آماری آنالیز بسیار قوی و نیرومندی به‌دست می‌دهد زیرا اطلاعات پیوستگی فقط سیگنال‌های پیوستگی واقعی را تأیید می‌کند (Pikkuhookana and Sillanpää, 2014). همچنین در مطالعه‌ای یک روش جدید ژنتیکی(گزینش برمبنای گروه اتصال (LGS)) توصیف شد که به دستیابی سریع مکان ژن‌های کدکننده فنوتیپ‌های قابل انتخاب از نگل های مالار یا انجامید (Culleton *et al.*, 2005). بنابراین با ترکیب نتایج LD در جمعیت نتاج و وراثت‌پذیری به‌دست‌آمده برای هر لوکوس، پنج گروه اتصال مرتبط با صفات طول کل و وزن کل به دست آمد و از آن جایی که وراثت پذیری برای صفت وزن در همه حالت‌های تک لوکوسی و به‌خصوص گروه‌های اتصال بسیار اندک بود بنابراین از وراثت‌پذیری این لوکوس‌ها برای صفت وزن کل در ماهی سفید چشم‌پوشی شد. از پنج گروه اتصال تعیین شده (LG1، LG2، LG3، LG4 و LG5) گروه اتصال LG3 بالاترین وراثت‌پذیری (۰/۵۲۷) را برای صفت طول کل نشان داد. ولی از آن‌جایی‌که لوکوس HL1 و HL2 در هر دو جمعیت مولدین و نتاج وضعیت ثابتی از نظر LD نداشتند و برای مشخص شدن وضعیت آن‌ها نیاز به یک نسل G2 است بنابراین گروه‌های شامل این دو لوکوس کنار گذاشته شدند که شامل LG1، LG2، LG3 و LG5 بودند. LG4 وراثت پذیری نسبتاً متوسطی (h^2 =۰/۴۳۲) برای صفت طول کل نشان داد که شامل لوکوس‌های HL3، HL4، HL5، HL6، HL7، HL8، HL9 و HL10 بود (هشت لوکوس با نُه ژنوتیپ).

با توجه به وجود همبستگی مثبت معنادار به‌دست‌آمده بین طول کل با وزن کل می‌توان از گروه اتصال LG4 برای دستیابی به وزن بیشتر در ماهی سفید استفاده کرد. بنابراین می‌توان فرض کرد که نتاج خانواده‌های با میانگین واریانس ژنتیکی بالاتر، طول کل بالاتر و متعاقباً وزن بالاتری نشان خواهند داد. براساس میانگین واریانس ژنتیکی نتاج خانواده ها همان‌طوری که در جدول ۱۰. مشاهده می شود، در گروه اول (شامل خانواده‌های شماره شش، یازده و هشت): با افزایش میانگین واریانس ژنتیکی نتاج، میانگین طول کل و متعاقب آن وزن کل نیز افزایش یافته‌است (به‌جز در مورد خانواده شماره هشت که میانگین وزن آن اندکی کمتر شد که به‌علت ناچیزبودن قابل چشم‌پوشی است). در گروه دوم (شامل خانواده‌های یک، دو، سه، چهار، نُه و دَه): خانواده‌های شماره یک، چهار و نُه از فرض ذکرشده تبعیت نکردند. خانواده شماره سه با دارابودن بالاترین میانگین واریانس ژنتیکی در بین

خانواده های این گروه، بالاترین طول کل و در نتیجه بالاترین میانگین وزن کل را نشان داد و خانواده شماره دو با توجه به میانگین واریانس خود نسبت به خانواده شماره سه از لحاظ میانگین‌های طول کل و وزن کل نیز در مرتبه دوم قرار گرفت. خانواده شماره دَه با نشان‌دادن کمترین میانگین واریانس ژنتیکی، کمترین میانگین طول کل را داشت و در مرتبه سوم قرار داده شد. از طرف دیگر، خانواده شماره نُه با وجود دارابودن میانگین واریانس ژنتیکی بالاتر نسبت به خانواده شماره دَه، طول کل بالاتر ولی وزن کمتری نشان داد. در گروه سوم (شامل خانواده‌های شماره هفت و پنج) میانگین واریانس ژنتیکی خانواده‌های این گروه هیچ ارتباطی با طول کل نشان ندادند و به عبارت دیگر از فرض ذکرشده تبعیت نکردند.

در بین این ۱۱ خانواده، بررسی تغییرات واریانس ژنتیکی تک‌تک افراد هر خانواده (جدول ۱۱) مشخص کرد که با افزایش و کاهش واریانس ژنتیکی افراد خانواده‌های شماره سه، چهار، پنج و شش به‌ترتیب طول کل و متعاقب آن وزن کل افزایش و کاهش نشان داد. بنابراین LG4 احتمالاً به یک QTL مرتبط با صفت طول کل متصل است. سایر خانواده‌ها چنین نظمی نشان ندادند که ممکن است به‌خاطر اثرات متقابل ژن‌های دیگر با LG4 با شد، همچنان‌که برا ساس Chistiakov و همکاران (۲۰۰۶) یک یا تعداد زیادی QTL می‌توانند در یک صفت یا فنوتیپ شرکت کنند. وقتی بیشتر از یک QTL یک صفت به‌خصوص را تحت تأثیر قرار می‌دهند هر یک ممکن است اندازه مؤثر متفاوتی داشته باشند و اثرات QTLهای افراد می‌تواند از قوی به ضعیف تغییر کند و اثر متقابل بین QTLها امری عادی است. بنابراین احتمال می‌رود LG4 به یک QTL کوچک-اثر متصل باشد.

نتیجه گیری کلی

با توجه به موارد ذکر شده در بالا، مولدین و نتاج مربوط به خانواده‌های شماره سه، چهار، پنج و شش براساس این‌که هر یک از نتاج این خانواده‌ها با افزایش و کاهش واریانس ژنتیکی گروه اتصال LG4 در طول و متعاقباً وزن کل به‌ترتیب افزایش و کاهش نشان دادند می‌توانند کاندید منا سبی برای کاربرد در آغاز ا صلاح نژاد ماهی سفید با شند. همچنین در بین گروه‌های خانوادگی، گروه اول (شامل خانواده‌های شش، یازده و هشت) به‌علت تبعیت از فرض ما که خانواده ها با افزایش و کاهش میانگین واریانس ژنتیکی در طول و متعاقباً وزن کل نیز به‌ترتیب افزایش و کاهش نشان دادند می‌تواند کاندید مطلوبی برای کاربرد در شروع برنامه اصلاح نژادی ماهی سفید باشد. بنابراین در مجموع شش خانواده (شامل خانواده‌های شماره سه، چهار، پنج، شش، یازده و هشت) برای کاربرد در شروع برنامه اصلاح نژاد ماهی سفید پیشنهاد می‌شوند.

۵. منابع

References

Afraei Bandpei MA, Mansor M, Abdolmalaki S, Keymaram F, Isa MM, Janbaz AA (2010) Age and growth of kutum (Rutilus frisii kutum, Kamensky, 1901) in southern Caspian Sea, *International Aquatic Research* 2(-),25-33

Alaei. Borujeni. P., Steinshamn. S.I., Mortazavi. S.A., Salehi. H., 2015. Enhance and advance: The benefits of recruitment enhancement in the case of the Iranian Kutum Fishery. *Marine Policy* 61(-), 23-32.

Baranski. M., Loughnan. S., Austin. C.M., Robinson. N., 2006. A microsatellite linkage map of the blacklip abalone (*Haliotis rubra*). *Animal Genetics* 37, 563-570.

Chistiakov. D.A., Hellemans. B., Haley. C.S., Law. A.S., Tsigenopoulos. C.S., Kotoulas. G., Bertotto. D., Libertini. A., Volckaert. F.A.M., 2005. A microsatellite linkage map of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Genetics* 170, 1821-1826.

Chistiacov. D.A., Hellemans. B., Volckaert. F.A.M., 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255, 1-29.

Culleton. R., Martinelli. A., Hunt P., Carter. R., 2005. Linkage group selection: Rapid gene discovery in malaria parasites. *Genome Research* 15, 92-97.

Gilbey. J., Verspoor. E., Mclay. A., Houlihan. D., 2004. A microsatellite linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Animal Genetics* 35, 98-105.

Guo. W., Yu. X., Tong. J., 2013. Development of 134 novel polynucleotide-repeat microsatellite markers in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Conservation Genetics Resources* 5, 525-528.

Hardy. O. J., Charbonnel. N., Fréville. H., Heuertz. M., 2003. Microsatellite allele sizes: A simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163, 1467-1482.

Ji. P., Zhang. Y., Li. C., Zhao. Z., Wang. J., Li. J., Xu. P., Sun. X., 2012. High throughput mining and characterization of microsatellites from common carp genome. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 9798-9807.

Laghari. M.Y., Lashari. P., Zhang. X., Xu. P., Tariq. Narejo. N., Xin. B., Zhang. Y., Sun X., 2015. QTL mapping for economically important traits of common carp (*cyprinus carpio L.*). *Journal of Applied Genetics* 56, 65-75.

Liu. H., Fu. B., Pang. M., Feng. X., Wang. X., Yu. X., Tong. J., 2016. QTL fine mapping and identification of candidate genes for growth-related traits in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Aquaculture* 465, 134-143.

Lund. M.S., Sørensen. P., Guldbrandtsen. B., Sorensen. D.A., 2003. Multi trait fine mapping of quantitative trait loci using combined linkage disequilibria and linkage analysis. *Genetics* 163, 405-410.

Lv. W., Zheng. X., Kuang. Y., Cao. D., Yan. Y., Sun. X., 2016. QTL variations for growth-related traits in eight distinct families of common carp (*Cyprinus carpio*). *BMC Genetics* 17,65. 1-12.

Pikkuhookana. P., Sillanpää. MJ., 2014. Combined linkage disequilibrium and linkage mapping: Bayesian multilocus approach. *Heredity* 112, 351-360.

Xia. J.H., Liu. F., Zhu. Z.Y., Fu. J., Feng. J., Li. J., Yue. G.H., 2010. A consensus linkage map of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on microsatellites and SNPs. *BMC Genomics* 11, 1-16.

Written by Bahrami. Rad. A., 2012. Available from: http://newposeidon.blogfa.com. In Persian.