

بررسی تأثیر رقابت اسپرم بر تنوع ژنتیکی نتاج قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

حسین مرادیان^۱، سعید کیوان شکوه^{۱*}، مصطفی محقق دولت آبادی^۲ و عین‌اله گرجی‌پور^۳
^۱ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
^۲ گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران
^۳ مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری، یاسوج، ایران

چکیده

در این پژوهش، با استفاده از اختلافات موجود میان خصوصیات کیفی اسپرم مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان، تأثیر شاخص‌های: تعداد و مدت زمان تحرک اسپرم بر موفقیت رقابت‌پذیری اسپرم بررسی شد. برای اجرای آزمایش تعداد سه قطعه ماهی نر و یک قطعه مولد ماده نیاز بود که این مولدین از میان گله مولدین چهار ساله انتخاب شدند. نسبت لاروهای حاصل از مولدین نر مختلف با استفاده از تجزیه و تحلیل جایگاه‌های ریزماهوره (دو جایگاه) مشخص گردید. لاروهای حاصل از نر شماره ۲ در این آزمایش غالب بودند. میزان مشارکت این مولد در تولید نتاج حاصله بر اساس آنالیز فراوانی آللی دو جایگاه OMM1036 و Ocl8 به ترتیب ۵۶ و ۴۸ درصد بود. انگشت‌نگاری DNA با استفاده از ریزماهوره‌ها نشان داد که مدت زمان تحرک اسپرم عامل تعیین‌کننده‌ای در موفقیت رقابت اسپرم‌ها بود. هیچ‌گونه ارتباطی میان میزان موفقیت لقاح و تعداد نسبی اسپرم و مدت زمان تحرک اسپرم مشاهده نشد. همبستگی بین تراکم اسپرم با میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج منفی و معنی‌دار بود ($r = -0.915$, $n = 30$). نتایج نشان داد که مدت زمان تحرک اسپرم به عنوان عاملی کلیدی در موفقیت رقابت اسپرم در قزل‌آلای رنگین‌کمان مطرح است. در هر دو گروه تیمارهای تک والدی و مختلط، زمانی که میزان مناسب اسپرم به ازای تخمک‌ها (۱۰۷) استفاده شد، درصد موفقیت لقاح بالا ($> 95\%$) بود و موفقیت لقاح به استفاده از اسپرم یک یا چند ماهی نر بستگی نداشت ($P > 0.05$).

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، رقابت اسپرم، ریزماهوره‌ها، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، لقاح

مقدمه
با افزایش تقاضای بچه ماهی قزل‌آلا

تکثیر و تولید در کشور طی سال‌های اخیر، تکثیر

مراکز
به همراه گسترش مراکز

مقدمه

با افزایش تقاضای بچه ماهی قزل‌آلا

تکثیر و تولید در کشور طی سال‌های اخیر، تکثیر

* keyvan56@kmsu.ac.ir

می‌کند رقابت اسپرم ایجاد شده در مراکز تکثیر به دلیل اختلاف موجود در شاخص‌های کمی و کیفی اسپرم (شامل تراکم، مدت زمان تحرک، سرعت اسپرم و...) می‌تواند سبب ایجاد تغییراتی در موفقیت تولید مثلی جنس نر شود و این امر به نوبه خود منجر به افزایش ضریب هم‌خونی و در نتیجه از بین رفتن تنوع ژنتیکی در نتاج تولید شده در مراکز تکثیر می‌شود و دیگر اینکه سبب تحریک انتخاب برخی از صفات خاص در جمعیت می‌گردد. علاوه بر این، هنگام استفاده از اسپرم چندین ماهی نر، به دلیل رقابت ایجاد شده و در نتیجه کاهش سهم افراد در بارورسازی تخمک‌ها، اثرات پدری بر روی مراحل اولیه زندگی تحت‌الشعاع قرار می‌گیرد (Rideout *et al.*, 2004). اعمال تکثیر می‌تواند خطرات بالایی را در رابطه با از دست رفتن تنوع ژنتیکی درون جمعیتی پیش بیاورد. یکی از راه‌های غیرمستقیمی که ممکن است موجب تغییر نسبت‌های جنسی شود، استفاده از اسپرم حاصل از چند ماهی نر است. مخلوط کردن اسپرم چندین ماهی نر می‌تواند به دلیل تفاوت جنس و خواص اسپرم، موجب نابرابر شدن سهم افراد نر در تأمین نسل آینده شود؛ در نتیجه، به علت آن که تعداد کمتری از افراد نر در مقایسه با تعدادی که واقعاً آمیزش یافته‌اند، سلول‌های جنسی را تأمین می‌کنند و یا به علت آن که تغییر در تعداد فرزندان حاصل از هر ماهی نر (تنوع در اندازه خانواده) افزایش می‌یابد، اندازه مؤثر جمعیت (N_e) کاهش می‌یابد. امروزه، تمایل بسیاری برای به‌کارگیری علم ژنتیک در افزایش کارایی تولید آبنزی‌پروری وجود دارد. طراحی یک برنامه اصلاح نژاد و کاهش اثرات هم‌خونی نیازمند مشخص نمودن والدین است.

غیراصولی پیش‌مولدین به ویژه مولدین نر زودرس باعث ایجاد اختلالات ژنتیکی و هم‌خونی در نسل مولدین و بروز صفات نامطلوب ناشی از آن شده است (علیزاده، ۱۳۸۶).

در حال حاضر، میزان موفقیت لقاح به عنوان یکی از معیارها برای ارزیابی و طبقه‌بندی کیفیت تخم‌قلمداد می‌شود، اما در واقع طبقه‌بندی کیفیت تخم توسط عوامل مختلفی از جمله کیفیت تخمک‌ها پیش از لقاح، تعداد اسپرماتوزآ و سرعت حرکت اسپرم تعیین می‌شود (Kamler, 2005). عمده توجه بخش آبنزی‌پروری بر کیفیت تخمک متمرکز شده است و خصوصیات اسپرم کمتر مد نظر قرار می‌گیرد، در حالی که هر دو این عوامل می‌توانند بر بقا و زنده‌مانی تخم و جنین تأثیرگذار باشند (Snook, 2005؛ Ottesen *et al.*, 2009). امروزه در تفریحگاه‌ها، بسیاری از گونه‌های آزاد ماهیان به منظور حفاظت یا تولید گوشت، مورد تکثیر مصنوعی قرار می‌گیرند. در اغلب موارد در تکثیر مصنوعی از گامت‌ها به صورت لقاح ترکیبی استفاده می‌کنند، به این صورت که تخمک‌های حاصل از چندین ماهی ماده را درون یک ظرف با اسپرم چند ماهی نر ترکیب می‌کنند (Campton, 2004). استفاده از این شیوه لقاح ممکن است سبب افزایش موفقیت لقاح و کاهش حجم کاری برای مدیران مزارع گردد. با این حال، استفاده از ترکیب اسپرم چندین ماهی جهت لقاح منجر به رقابت اسپرم که یکی از نیرومندترین روش‌های به‌گزینی جنسی است، می‌گردد (Birkhead and Møller, 1998؛ Snook, 2005). Campton (۲۰۰۴) دو مشکل اساسی ناشی از استفاده از اسپرم مختلط را شرح داده است که به طور خلاصه بیان

سهم ماهیان در ایجاد نسل جدید در مراکز تکثیر قزل‌آلای رنگین‌کمان نامشخص است. یکی از متغیرهای آمیزشی در شرایط آزمایشگاهی ترکیب جنسی مولدین است. در دهه اخیر، مطالعات متعددی با استفاده از نشانگرهای چندشکلی و به ویژه ریزماهوره‌ها در تعیین والدین ماهیان پرورشی صورت گرفته است (Perez-Herbinger *et al.*, 1995؛ Jackson *et al.*, Enrique and Tanigushi, 1999؛ McDonald *et al.*, Castro *et al.*, 2004؛ 2003؛ Sekino *et al.*, 2004؛ 2004).

از جمله نشانگرهای مولکولی، ریزماهوره‌ها هستند که با داشتن مزایایی چون چندشکلی بالا، طبیعت چند اللی، توارث همباز، طول کوتاه، پراکنش ژنومی وسیع، نسبت و فراوانی بالا، موجب شده که کاربرد موفقیت‌آمیز با تنوع زیاد در رشته‌های مختلف تحقیقاتی و عملی داشته باشند. همچنین، ریزماهوره‌ها در زمینه شیلات و آبی‌پروری برای توصیف ذخایر ژنتیکی، انتخاب ذخایر مولدین، شناسایی ژن‌های کدکننده صفات مهم اقتصادی، برنامه‌های تولید مثلی، مطالعه ساختار جمعیتی، تفکیک نژادهای پرورشی از نژادهای وحشی، ارزیابی رابطه ژنتیکی والدین با فرزندان، مدیریت مولدین، تشخیص ماده‌زایی، پلی‌پلوئیدی، تشخیص دورگه‌ها و ارزیابی تکامل، کارآیی بالایی دارند (Castro *et al.*؛ Wilson and Ferguson, 2002؛ Chistiakov *et al.*, 2006؛ *al.*, 2004). هدف از انجام این تحقیق، بررسی تأثیرات رقابت اسپرم بر تنوع ژنتیکی نسل F1 و درک مکانیسم‌های دخیل در رقابت اسپرم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است. در این تحقیق، تأثیر اسپرم مخلوط چندین مولد نر بر میزان

لقاح نیز بررسی شد.

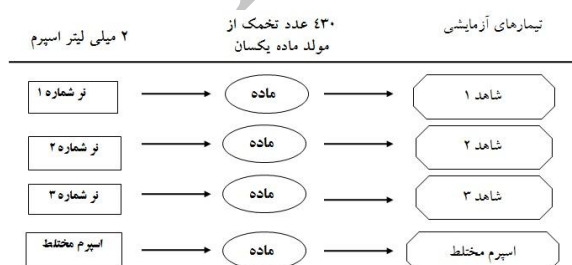
مواد و روش کار

انتخاب مولدین: در این مطالعه، برای اجرای آزمایش تعداد سه قطعه ماهی نر و یک قطعه مولد ماده مورد نیاز بود که این مولدین پس از بررسی، از میان گله مولدین چهار ساله مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج انتخاب شدند. برای انتخاب مولدین معیارهایی از قبیل سلامت ظاهری ماهی و کیفیت گامت‌ها (شامل مدت زمان تحرک و تراکم اسپرم) مد نظر قرار گرفت. به منظور دقت بیشتر در اجرای آزمایش ابتدا حدود دو میلی‌لیتر اسپرم از ۱۰ قطعه مولد گرفته شد و پس از ارزیابی اسپرم آنها سه مولد نر یعنی نرهای شماره ۱، ۲ و ۳ به ترتیب با وزن‌های ۱۵۸۰، ۱۸۴۰ و ۱۷۱۰ گرم انتخاب شدند. همچنین برای تهیه مولد ماده پس از انجام زیست‌سنجی، از بین سه مولد بهترین آنها بر اساس شاخص‌های ظاهری انتخاب شد. سپس مولدین به مخازن فایبرگلاس ۲۲۰ لیتری منتقل شدند.

جمع‌آوری اسپرم و تخمک: اسپرم‌گیری از مولدین در اواخر اسفند ماه سال ۱۳۸۷ در طول فصل تکثیر طبیعی صورت گرفت. مولدین نر پس از معاینه و بیهوشی توسط پودر گل میخک (۱۵۰ ppm) (مهرابی، ۱۳۸۱) ابتدا زیست‌سنجی شده، سپس با ماساژ شکمی به طور جداگانه اقدام به اسپرم‌کشی از آنها گردید. برای ممانعت از بروز هر گونه آلودگی ناحیه شکمی توسط عواملی از قبیل آب، موکوس و ادرار، هر ماهی به دقت توسط حوله خشک شد (Dreanno *et al.*, 1998). پیش از لقاح، تراکم اسپرم از طریق شمارش اسپرم‌ها بر روی لام

آزمایش در نظر گرفته شد.

برای انجام لقاح از حجم یکسان اسپرم (۲ میلی لیتر) استفاده شد. حجم اسپرم مورد نیاز جهت انجام لقاح بر اساس شمارش اسپرم‌های هر ماهی انتخاب شد، به طوری که شرایط به گونه‌ای باشد که نسبت اسپرم به تخم که جهت لقاح موفق ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پیشنهاد شده است به صورت 1×10^7 باشد (Scott and Baynes, 1980). برای این منظور در سه تیمار اول، دوم و سوم (شاهد ۱، ۲ و ۳) که به ترتیب مربوط به نرهای شماره ۱، ۲ و ۳ هستند، دو میلی لیتر اسپرم به هر ظرف اضافه شد و برای تیمار چهارم (تیمار ترکیب اسپرم) ابتدا حجم یکسان از اسپرم هر سه مولد نر را در یک ظرف مخلوط کرده (هر مولد ۲ میلی لیتر و در مجموع ۶ میلی لیتر)، با همان حجم دو میلی لیتر اسپرم اضافه گردید (شکل ۱). به منظور اطمینان از قابلیت بارورسازی، موفقیت در میزان تفریح و کیفیت تخمک در سه تیمار اول، اسپرم هر ماهی نر به صورت جداگانه اضافه شد و در تیمار چهارم ترکیب سه اسپرم پس از مخلوط و همگن شدن به همان حجم اضافه شد. لقاح با استفاده از حجم یکسان اسپرم در سه ماهی نر شماره ۱، ۲ و ۳ انجام شد و در تیمار مختلط حجم یکسان مخلوط اسپرم سه ماهی (۲ میلی لیتر) استفاده شد.



شکل ۱- نمای کلی از طراحی آزمایش شامل یک مولد ماده و سه مولد نر

هماسیتومتر تخمین زده شد. به منظور رسیدن اسپرم‌ها به تراکم قابل شمارش، نمونه‌ها در سرم فیزیولوژیک $0/6$ تا $0/7$ درصد با نسبت ۱ به ۱۰۰۰ رقیق‌سازی شد. تعداد متوسط اسپرم‌ها برای هر ماهی با سه شمارش محاسبه گردید. تراکم اسپرم با در نظر گرفتن میزان رقیق‌سازی به صورت تعداد اسپرم‌ها در یک میلی لیتر مایع منی بیان شد (Geffen and Evans, 2000). جهت استخراج DNA، قطعه‌ای از باله دمی هر کدام از مولدین نر برداشته، در اتانول ۹۶ درصد تثبیت شد.

بورسی و ارزیابی کیفیت اسپرم: مدت زمان

تحرك اسپرم زمانی است که پس از فعال‌سازی، ۹۵ درصد اسپرم‌ها حرکت رو به جلو داشته باشند. به منظور ارزیابی تحرك اسپرم، پس از اسپرم‌گیری حدود ۱۰ میکرولیتر از اسپرم بر روی لام قرار داده، سپس، توسط یک فعال‌کننده (آب) فعال شد و مدت زمان تحرك تا زمانی که تمام اسپرم‌ها غیرفعال شوند توسط کورنومتر ثبت گردید. مدت زمان‌هایی که ۹۵ درصد اسپرم‌ها تحرك خود را از دست دادند نیز ثبت گردید (Nagler *et al*, 2000). تمام اندازه‌گیری‌ها به منظور اطمینان از تکرارپذیری و قابل اعتماد بودن داده‌ها سه بار صورت گرفت.

طراحی آزمایش رقابت اسپرم: حدود دو ساعت

پیش از شروع عملیات تکثیر و اجرای آزمایش رقابت اسپرم، به منظور ارزیابی شاخص‌های کیفی اسپرم از سه مولد نر حدود دو میلی لیتر اسپرم گرفته شد. سپس تخم‌گیری از مولد ماده انجام شد، تخمک‌ها توزین شدند و به صورت مساوی در ۱۲ قسمت (چهار تیمار و سه تکرار) در ظروف کوچک تقسیم‌بندی شدند. بدین ترتیب که حدود ۴۳۰ عدد تخم برای هر

تا ۱۸ روز پس از لقاح، در این مرحله درصد چشم‌زدگی تخم‌ها با رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\times 100 = \frac{\text{تعداد تخم‌های چشم‌زده}}{\text{تعداد تخم‌های لقاح یافته}} = \text{درصد چشم‌زدگی}$$

۳۰ تا ۳۳ روز پس از لقاح، لاروهای تفریخ‌شده شمارش گردید. در این مرحله، درصد تفریخ لاروها از رابطه زیر محاسبه گردید (Ottesen *et al.*, 2009):

$$\times 100 = \frac{\text{تعداد لاروهای تفریخ شده}}{\text{تعداد تخم‌های چشم‌زده}} = \text{درصد تفریخ لاروها}$$

بررسی ژنتیکی مولدین و نتاج: نمونه‌برداری از مولدین نر در زمان اسپرم‌گیری صورت پذیرفت. پس از تفریخ نیز، تمامی لاروها به دقت بررسی شدند. سپس تعداد ۱۰ قطعه لارو از هر تکرار به صورت تصادفی برداشته، در اتانول ۹۶ درصد تثبیت گردید. استخراج DNA با استفاده از کیت‌های استخراج DNA محصول شرکت سیناژن (DNA DNPTM) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد ارزیابی شد (McQuown *et al.*, 2000). واکنش PCR برای تمام نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ساخته شده انجام شد و بهترین دمای الحاق برای هر یک از آغازگرها به دست آمد. تجزیه و تحلیل ژنتیک نتاج مربوط به هر تیمار با استفاده از ۶ آغازگر ریزماهوره ویژه آزادماهیان (جدول ۱) انجام شد (Johnson *et al.*, 2007). این آغازگرها بر اساس سایر مطالعات روی آزادماهیان انتخاب شدند. معیارهای که در انتخاب این آغازگرها مد نظر قرار گرفت شامل عدم مضاعف‌سازی (non-duplication) آنها و مشاهده نشدن آلل‌های پوچ هستند.

پس از افزودن اسپرم، به مدت یک دقیقه مخلوط اسپرم و تخمک به هم زده شد تا لقاح صورت پذیرد. سپس مقداری آب چشمه اضافه شد که با هم زدن آنها در مدت ۱ تا ۲ دقیقه عمل لقاح انجام می‌گیرد. در ادامه، به مدت ۵ دقیقه تخم‌ها در همین حالت نگه داشته شد و پس از این مدت زمان تخم‌ها به تدریج شسته شدند تا اسپرم اضافی خارج و آب حاوی تخم‌ها کاملاً شفاف گردد. در مرحله بعد، به منظور جذب آب توسط تخم‌ها مقداری از آب چشمه تأمین‌کننده آب سالن انکوباسیون را اضافه کرده، اجازه داده شد تا حدود ۴۵ دقیقه فرآیند جذب آب طول بکشد (Nilsson and Cloud, 1992).

مرحله انکوباسیون و تولید لارو: پس از انجام عملیات لقاح، تخم‌های لقاح یافته به سالن انکوباسیون، که آب آن توسط چشمه با دمای $10/8 \pm 0/5$ درجه سانتیگراد تأمین می‌شد منتقل شد. تخم‌ها و لاروها مراحل انکوباسیون را در شرایط تاریکی طی کردند و در بررسی‌های روزانه میزان تلفات جمع‌آوری و ثبت شد. برای نمونه‌برداری، لاروها تا زمان شروع تغذیه فعال که حدود ۵۰ روز طول کشید، نگهداری شدند. ۸ روز پس از لقاح تعداد ۳۰ عدد تخم از هر واحد آزمایشگاهی برداشته، در یک پتری‌دیش حاوی محلول استیک اسید، متانول و آب مقطر (با نسبت ۱:۱:۱) قرار داده، پس از ۵ دقیقه تخم‌های لقاح یافته به راحتی از طریق حضور یک کمربند عصبی واضح از تخم‌های لقاح نیافته مشخص شدند (Springate *et al.*, 1984; Ottesen *et al.*, 2009; Geffen and Evans, 2000).

$$\times 100 = \frac{\text{تعداد تخم‌های لقاح یافته}}{\text{تعداد کل تخمک‌ها}} = \text{درصد لقاح}$$

پس از آن با ۳۰ چرخه ۳۰ ثانیه‌ای در ۹۴ درجه، ۵۰ ثانیه در دمای اتصال مربوط (جدول ۱) و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد ادامه یافت. برنامه فوق با درجه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بسط و خاتمه یافت. الکتروفورز محصول PCR، با استفاده از ژل پلی‌اکریل آمید ۶ درصد صورت گرفت و از رنگ آمیزی نترات نقره برای ظاهر سازی باندها روی ژل پلی‌اکریل آمید استفاده شد (Pourkazemi, 1996).

برای انجام PCR با توجه به تعداد تیوب‌ها یک مخلوط PCR برای همه آنها تهیه گردید. در هر واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر از حدود ۵۰ نانوگرم DNA، ۱X بافر PCR، ۲۰۰ میکرومولار از هر dNTP، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۷ واحد آنزیم تگ پلیمراز و ۱/۷۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم استفاده شد. برنامه حرارتی PCR نیز به صورت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه جهت واسرشت سازی اولیه تنظیم شد و

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای استفاده شده برای بررسی ژنتیکی مولدین و نتاج

نام جایگاه ژنی	واحد تکرار شونده	توالی آغازگرهای رفت (forward) و برگشت (reverse)	دمای اتصال (°C)
OMM1036	TATC	F-TGTAGCAGGTGAGAATACCCA R-CACCATCTCCATCCTAGGC	۶۰
Ssa85	GT	F-AGGTGGGTCTCCAAGCTAC R-ACCCGCTCCTCACTTAATC	۵۵
Ocl8	GT	F-TAGTGTTCCGTGTTTCGCCTG R-CACCTCCATCTCTCATTCCAC	۵۷
OMM1307	CTAT	F-GCACAACACTACGAAACCCAA R-TGCCAGCTCTGCTATGACATT	۵۲
OMM1315	CATC	F-TACAGGGCTTGGCTCTATCTC R-GCCAAATACTTTCGCAAGG	۶۱
Ssa197	GTGA	F-GGGTTGAGTAGGGAGGCTTG R-TGGCAGGGATTTGACATAAC	۶۰

از آزمون توکی برای بررسی معنی دار بودن اختلاف میانگین‌ها و سطح معنی داری استفاده شد. سنجش تأثیر شاخص‌های اسپرم‌شناختی بر روی میزان لقاح، درصد چشم‌زدگی، تفریح و بازماندگی لارو از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. رسم نمودارها در برنامه Excel انجام شد. در نهایت، از ضریب همبستگی پیرسون برای درک ارتباط خطی بین شاخص‌های کیفی اسپرم و میزان مشارکت مولدین استفاده شد.

نتایج

ارزیابی شاخص‌های کیفی اسپرم مولدین:
بیشترین مدت زمان تحرک اسپرم مربوط به اسپرم ماهی

تجزیه داده‌ها

پس از تعیین ژنوتیپ‌های تمامی افراد، داده‌ها وارد نرم‌افزار GENALEX 6 (www.anu.edu.au) شد و شاخص‌هایی نظیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_0) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) محاسبه شدند. پیش‌بینی و همچنین ردیابی هر کدام از لاروها، با نرم‌افزار FAP (Family Analysis Program) بر اساس روش حذفی صورت گرفت (Ottesen *et al.*, 2009). اطلاعات جمع‌آوری شده با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶/۰ بررسی شد. تأیید نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولوموگروف-اسمیرنوف انجام و وجود اختلاف آماری با آنالیز واریانس (ANOVA) مشخص گردید.

مرحله چشم زدگی رسیدند و تخم گشایی آنها در روز سی و دوم کامل شده و شروع تغذیه فعال آنها در روز پنجاهم بود (جدول ۳).

نتایج PCR: پس از تغییر شرایط PCR بهترین شرایط به دست آمده از نظر غلظت مواد و شرایط برنامه دمایی به نحوی که حداقل باند اضافی را دارا باشد و باندهای اصلی دارای وضوح کامل باشند طبق شرایط جدول ۴ به دست آمد. از بین ۶ آغازگر استفاده شده آغازگرهای OMM1036 و Ocl8 تولید باندهای چندشکل نمودند، آغازگرهای Ssa85 و OMM1307 باند DNA ایجاد کردند ولی به صورت تک شکل بودند و در بررسی‌ها استفاده نشدند. آغازگرهای به کار گرفته شده OMM1315 و Ssa197 در این بررسی باندهای ایجاد نمودند.

نر شماره ۲ با مدت زمان ۵۳/۶۰ ثانیه بود. مدت زمان تحرک اسپرم برای ماهیان نر شماره ۳، ۱ و مخلوط اسپرم به ترتیب ۴۳/۹۰ و ۴۳/۴۶ و ۳۹/۴۳ ثانیه بود (جدول ۲). مدت زمان تحرک اسپرم در مولد نر شماره ۲ به طور معنی داری بیشتر از سایر مولدین نر بود ($P < 0.05$), در حالی که اختلاف معنی داری در مدت زمان تحرک سایر تیمارها مشاهده نشد ($P \geq 0.05$). بیشترین تراکم اسپرم $(10.9 \times 1/11 \pm 15/91)$ مربوط به ماهی نر شماره ۳ بود که بیشتر از بقیه تیمارها بود و این اختلاف از نظر آماری با نرهای شماره ۱ و ۲ معنی دار بود ($P < 0.05$), ولی با تیمار مخلوط اسپرم اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P \geq 0.05$).

درصد لقاح، چشم زدگی و میزان تفریح: جنین‌ها

در روز نهم به مرحله اندام‌زایی و در هجدهمین روز به

جدول ۲- میانگین ویژگی‌های زیست‌سنجی و کیفی اسپرم مولدین نر. وجود حداقل یک حرف مشترک در هر ردیف بیانگر عدم اختلاف معنی دار است و حروف غیر مشترک بیانگر اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) است.

تیمار	وزن بدن (گرم)	طول کل (سانتی‌متر)	حجم اسپرم (میلی‌لیتر)	مدت زمان تحرک (ثانیه)	تراکم اسپرم 10^9 Cell/ml
نر شماره ۱	۱۵۸۰	۴۵	۱۲	۴۳/۴۶ ± ۰/۹۹ ^a	۱۳/۲۰ ± ۱/۱۲ ^a
نر شماره ۲	۱۸۴۰	۴۷	۱۳	۵۳/۶۰ ± ۴/۹۳ ^b	۱۱/۹۱ ± ۰/۵۵ ^a
نر شماره ۳	۱۷۱۰	۴۵	۱۲	۴۳/۹۰ ± ۲/۰۴ ^a	۱۵/۹۱ ± ۱/۱۱ ^b
اسپرم مختلط	-	-	-	۳۹/۴۳ ± ۲/۴۲ ^a	۱۳/۸۰ ± ۰/۳۶ ^{ab}

جدول ۳- درصد لقاح، چشم زدگی و تفریح در تیمارهای تک والدی و مختلط. وجود حداقل یک حرف مشترک در هر ردیف بیانگر عدم اختلاف معنی دار و حروف غیر مشترک بیانگر اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) است.

تیمار	لقاح (درصد ± انحراف معیار)	چشم زدگی (درصد ± انحراف معیار)	تفریح (درصد ± انحراف معیار)
نر شماره ۱	۹۶/۶۶ ± ۳/۳۳ ^a	۹۵/۵۰ ± ۰/۷۹ ^a	۹۶/۴۱ ± ۰/۹۹ ^a
نر شماره ۲	۹۸/۸۹ ± ۱/۹۳ ^a	۹۵/۹۳ ± ۱/۹۲ ^a	۹۶/۳۲ ± ۱/۹۹ ^a
نر شماره ۳	۹۵/۵۵ ± ۱/۹۲ ^a	۹۴/۷۸ ± ۱/۸۴ ^a	۸۸/۲۱ ± ۳/۳۳ ^b
اسپرم مختلط	۹۹/۳۳ ± ۱/۱۵ ^a	۹۶/۸۷ ± ۰/۳۹ ^a	۹۴/۴۵ ± ۱/۶۲ ^a

متغیر بود. جایگاه‌های ژنی چندشکل OMM1036 و OC18 تنوع ژنتیکی و قدرت ردیابی مناسبی را در مجموع مولدین نر نشان دادند و به منظور محاسبه شاخص‌های تنوع ژنتیکی در لاروها و ردیابی والدین و فرزندان در تیمارهای مختلف استفاده شدند. نتایج تخمین آلل‌های صفر در هر دو جایگاه ژنی منفی بود (جدول ۶).

جدول ۶- تخمین شاخص‌های تنوع ژنتیکی در دو جایگاه مختلف چندشکل در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. N.A: تعداد آلل‌ها، Ho: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، He: هتروزیگوسیتی مورد انتظار، PIC: محتوای اطلاعات چندشکلی، Excl1: قدرت هر جایگاه ژنی برای ردیابی والدین و فرزندان هنگامی که اطلاعات ژنتیکی یکی از والدین موجود نباشد، Excl2: قدرت هر جایگاه ژنی برای ردیابی والدین و فرزندان هنگامی که ژنتیکی هر دو والد موجود باشد. Nu: فراوانی آلل‌های صفر.

جایگاه ژنی	N.A	Ho	He	PIC	Excl1	Excl2	Nu
OMM1036	۶	۰/۹۵۶	۰/۸۷۲	۰/۸۲۶	۰/۶۶۸	۰/۷۸۷	۰/۰۴۵
OC18	۴	۰/۹۱۴	۰/۸۵۸	۰/۷۳۲	۰/۵۳۶	۰/۶۴۸	۰/۰۶۵

برای مقایسه شاخص‌های تنوع ژنتیکی مولدین نر و لاروهای قزل‌آلای رنگین کمان، تعداد آلل‌ها، هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و محتوای اطلاعات چندشکلی در تیمارهای مختلف آورده شده است (جدول ۷). در تیمار اول تعداد آلل‌ها بین مولدین و لاروها در هر دو جایگاه ژنی چندشکل OMM1036 و OC18 یکسان بود. هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و محتوای اطلاعات چندشکلی در هر دو جایگاه ژنی چندشکل ریزماهواره در لاروها نسبت به مولدین نر کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). در تیمار دوم تعداد آلل‌ها بین مولدین نر و لاروها در جایگاه ژنی OMM1036 یکسان و در جایگاه ژنی OC18 در لاروها کمتر بود.

جدول ۴- نتایج PCR حاصل از آغازگرهای استفاده شده در

آنالیز ریزماهواره قزل‌آلای رنگین کمان

جایگاه ژن	اندازه آلل	تعداد آلل
OMM1036	۲۲۵-۳۲۱	۱۴
Ssa85	۹۶-۱۶۴	مونومورف
Ocl8	۱۰۳-۱۵۳	۱۲
OMM1307	۱۸۶-۲۰۶	مونومورف
OMM1315	عدم تولید باند	-
Ssa197	عدم تولید باند	-

شاخص‌های تنوع ژنتیکی و قدرت ردیابی جایگاه‌های ژنی: فراوانی آللی جایگاه‌های مطالعه

شده در جدول ۵ آمده است. در جایگاه ژنی OMM1036 بیشترین فراوانی آللی ۰/۲۹۷۹ مربوط به آلل F و کمترین فراوانی ۰/۰۹۴۶ مربوط به آلل D است. در جایگاه ژنی Ocl8 بیشترین فراوانی آللی ۰/۲۹۱۱ مربوط به آلل D و کمترین فراوانی ۰/۱۲۴۶ مربوط به آلل A است.

جدول ۵- اندازه و فراوانی آللی در دو جایگاه مختلف چندشکل در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

جایگاه	Ocl8		OMM1036	
	اندازه آللی (جفت باز)	فراوانی آللی	اندازه آللی (جفت باز)	فراوانی آللی
A	۱۵۲	۰/۱۲۴۶	۳۲۷	۰/۱۴۱۷
B	۱۴۷	۰/۱۹۹	۲۲۱	۰/۱۹۷۵
C	۱۱۲	۰/۳۸۵۳	۱۷۶	۰/۰۹۶۴
D	۸۵	۰/۲۹۱۱	۱۳۵	۰/۰۹۴۶
E	-	-	۳۱۶	۰/۱۷۱۹
F	-	-	۱۷۲	۰/۲۹۷۹

نتایج بررسی و تحلیل تنوع ژنتیکی مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین با استفاده از جایگاه‌های ژنی ریزماهواره نشان داد که تعداد آلل‌ها در مولدین نر ۶ و ۴ آلل به ترتیب برای جایگاه‌های چندشکل OMM1036 و OC18 و سه آلل برای جایگاه تک‌شکل

چندشکل ریزماهواره در لاروها نسبت به مولدین نر کاهش معنی داری داشت ($P < 0/05$). در تیمار چهارم تعداد آلل‌ها بین مولدین و لاروها در هر دو جایگاه ژنی چندشکل OMM1036 و OCI8 یکسان بود. هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و محتوای اطلاعات چندشکلی در هر دو جایگاه ژنی چندشکل ریزماهواره در لاروها نسبت به مولدین کاهش معنی داری داشت ($P < 0/05$).

هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و محتوای اطلاعات چندشکلی در هر دو جایگاه ژنی چندشکل ریزماهواره در لاروها نسبت به مولدین نر کاهش معنی داری داشت ($P < 0/05$). در تیمار سوم تعداد آلل‌ها بین مولدین نر و لاروها در هر دو جایگاه ژنی چندشکل OMM1036 و OCI8 یکسان بود. هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و محتوای اطلاعات چندشکلی در هر دو جایگاه ژنی

جدول ۷- مقایسه شاخص‌های تنوع ژنتیکی در دو جایگاه مختلف چندشکل در ماهی قزل آلای رنگین کمان

شاخص	جایگاه ژنی	OMM1036		OCI8		میانگین
		مولدین نر	لاروها	مولدین نر	لاروها	
N.A. (تعداد آلل‌ها)	تیمار اول	۶	۶	۴	۴	۵
	تیمار دوم	۵	۵	۴	۳	۱۰
	تیمار سوم	۵	۴	۳	۳	۳/۵
	تیمار چهارم	۶	۶	۴	۴	۵
He (هتروزیگوسیتی مشاهده شده)	تیمار اول	۰/۸۸۷	۰/۷۸۷	۰/۸۴۸	۰/۷۲۲	۰/۷۵۴ ± ۰/۰۱۱
	تیمار دوم	۰/۹۱۲	۰/۸۲۳	۰/۸۵۶	۰/۶۸۹	۰/۷۵۶ ± ۰/۰۰۷
	تیمار سوم	۰/۹۴۵	۰/۸۳۵	۰/۸۶۸	۰/۷۳۶	۰/۷۷۳ ± ۰/۰۰۹
	تیمار چهارم	۰/۹۳۶	۰/۸۵۲	۰/۷۹۹	۰/۷۲۲	۰/۷۸۱ ± ۰/۰۰۷
Ho (هتروزیگوسیتی مورد انتظار)	تیمار اول	۰/۹۸۳	۰/۸۵۴	۰/۸۶۸	۰/۶۸۸	۰/۷۸۱ ± ۰/۰۰۵
	تیمار دوم	۰/۹۷۸	۰/۹۲۱	۰/۸۶۷	۰/۷۰۳	۰/۸۱۲ ± ۰/۰۰۲
	تیمار سوم	۱	۰/۹۳۴	۰/۹۱۹	۰/۷۵۹	۰/۸۶۰ ± ۰/۰۱۹
	تیمار چهارم	۰/۹۹۲	۰/۸۹۹	۰/۸۴۵	۰/۶۸۲	۰/۷۹۰ ± ۰/۰۱۰
PIC (محتوای اطلاعات چندشکلی)	تیمار اول	۰/۸۴۸	۰/۷۶۹	۰/۷۲۴	۰/۶۵۵	۰/۷۱۲ ± ۰/۰۰۹
	تیمار دوم	۰/۸۳۳	۰/۷۹۹	۰/۷۸۴	۰/۶۵۶	۰/۷۲۸ ± ۰/۰۰۷
	تیمار سوم	۰/۸۳۷	۰/۸۰۱	۰/۷۴۵	۰/۶۰۹	۰/۷۰۵ ± ۰/۰۰۸
	تیمار چهارم	۰/۸۴۹	۰/۸۰۹	۰/۷۷۴	۰/۷۴۵	۰/۷۶۷ ± ۰/۰۱۱

اساس فروانی آللی ۵۶ درصد از شناسایی نتاج حاصل از لقاح مولدین نر و ماده با خصوصیات اسپرم‌شناختی مختلف مربوط به والد نر شماره ۲ بود که سهم نتاج حاصل از لقاح اسپرم مولدین نر شماره ۱ و نر شماره ۳

میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج: نتایج بررسی در جایگاه‌های چندشکل در گروه اول لاروهای حاصل از ترکیب اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان نشان داد که در جایگاه چندشکل OMM1036 بر

در تولید نتاج بود ($P < 0.01$, $t = 0.857$, $n = 30$). همبستگی بین تراکم اسپرم با میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج نیز منفی و معنی‌دار بود ($n = 30$, $P < 0.01$, $t = -0.915$).

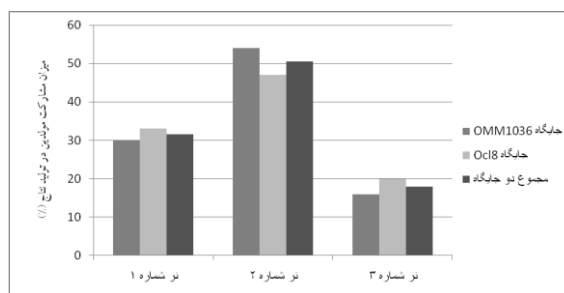
نتیجه‌گیری و بحث

در اغلب مطالعات انجام شده در خصوص مدت زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان، مقادیر متغیری به دست آمده است که صحت این نتایج به تجربه و روش کار بستگی دارد. با بررسی این نتایج می‌توان به این نتیجه رسید که مدت زمان تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلا مطابق با خانواده آزادماهیان است، به طوری که این میزان بین ۱۲/۸ ثانیه تا ۹۹ ثانیه برآورد شده است (Buyukhatipoglu and Holtz, 1984; Geffen and Evans, 2000). نتایج پژوهش حاضر نیز مدت زمان تحرک در همین محدوده بوده است (۳۹/۴۳ تا ۵۳/۶۰). کاهش مدت زمان تحرک در تیمار اسپرم مختلط شاید به دلایلی از جمله برهم‌کنش‌های بیوشیمیایی میان اسپرم‌ها و یا برهم خوردن تعادل یونی مایع سمینال باشد.

تراکم اسپرم نیز از $11/91 \pm 0/55$ میلیارد در میلی‌لیتر اسپرم در نر شماره ۲ تا $15/91 \pm 1/11$ میلیارد در نر شماره ۳ متغیر بوده است. اختلاف در برآورد تراکم اسپرم در مطالعات مختلف می‌تواند به دلایل متفاوتی از جمله نوع پیست کردن (Tvedt et al., 2001)، نوع روش و دستگاه استفاده شده برای ارزیابی باشد. همچنین، تراکم در بین گونه‌های هم‌نوع و در طول فصل تولید مثل متغیر است (Rurangwa et al., 2004). الزاماً اسپرم‌هایی که دارای تراکم بالا هستند بیشترین تحرک و یا بالاترین میزان بارورسازی را

با مولد ماده به ترتیب ۳۰ و ۱۴ درصد بوده است. همچنین، در مورد جایگاه چندشکل Ocl8 سهم والد نر شماره ۲، ۴۸ درصد بود و سهم نتاج با مولدین نر شماره ۱ و شماره ۳ با مولد ماده به ترتیب ۳۲ و ۲۰ درصد به دست آمد.

در گروه دوم لاروهای حاصل از ترکیب اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز نتایج بررسی در جایگاه‌های چندشکل نشان داد که در جایگاه چندشکل OMM1036 بر اساس فراوانی آللی، ۵۴ درصد از شناسایی نتاج حاصل از لقاح مولدین نر و ماده با خصوصیات اسپرم‌شناختی مختلف مربوط به والد نر شماره ۲ بود که سهم نتاج حاصل از لقاح اسپرم مولدین نر شماره ۱ و نر شماره ۳ با مولد ماده به ترتیب ۲۶ و ۲۰ درصد بوده است. همچنین، در مورد جایگاه چندشکل Ocl8 سهم والد نر شماره دو، ۴۹ درصد بود و سهم نتاج با مولدین نر شماره ۱ و شماره ۳ با مولد ماده به ترتیب ۳۲ و ۱۹ درصد به دست آمد (جدول ۷ و شکل ۲).



شکل ۲- میزان مشارکت مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان در تولید لاروها (درصد) در تیمار لقاح اسپرم مختلط (تیمار چهارم)

همبستگی شاخص‌های کیفی اسپرم با میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج: همبستگی شاخص‌های کیفی اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر در تولید نتاج، نشان‌دهنده همبستگی مثبت و معنی‌دار بین مدت زمان تحرک اسپرم با میزان مشارکت مولدین

موفقیت تولید مثلی مولدین نر در شرایط رقابت اسپرم با مدت زمان تحرک اسپرم در ارتباط بود (Tuest *et al.*, 2008). در ماهی هالیبوت اقیانوس اطلس (*Hippoglossus hippoglossus*) نیز همبستگی مثبت و معنی داری بین تحرک اسپرم و موفقیت تولید مثلی مولدین نر مشاهده گردید (Tvedt *et al.*, 2001). سوری نژاد (۱۳۸۹) نیز در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) رابطه مثبت و معنی داری را بین مدت زمان تحرک اسپرم و تعداد نتاج تولید شده توسط مولدین نر نشان داده است. در مطالعه‌ای دیگر که توسط Birkhead و همکارانش در سال ۱۹۹۹ صورت گرفت، تحرک اسپرم به عنوان عاملی مهم در موفقیت رقابت بارورسازی شناخته شده است. در نقطه مقابل، تولید لارو در روغن ماهی *Gadus morhua* (Trippel and Neilson, 1992) و در ماهی Walleye (*Sander vitreus*) از خانواده سوف ماهیان (Casselmann *et al.*, 2006) با میزان تحرک اسپرم همبستگی معنی داری نداشته است.

در تحقیق حاضر، استفاده از نشانگرهای ریزماهواره با میزان مناسبی از قدرت ردیابی والدین در ماهی قزل آلالی رنگین کمان همراه بود. والدین لاروهایی که به شیوه لقاح اسپرم مختلط تولید شده بودند، با به کارگیری تکنیک ردیابی والدین در نرم افزار FAP و با استفاده از دو جایگاه ریزماهواره مشخص گردیدند. در تیمار اول ۹۴/۸، در تیمار دوم ۹۴/۳، در تیمار سوم ۹۶/۸ و در تیمار چهارم ۹۷/۷ درصد از لاروها به مولدین نر و ماده تشکیل دهنده ردیابی شدند. در میان گزارش‌های منتشر شده در زمینه استفاده از جایگاه‌های ژنی ریزماهواره برای

نخواهند داشت (Geffen and Evans, 2000; Williot *et al.*, 2000). بنابراین، تراکم اسپرم را نمی‌توان به عنوان یک مقیاس ویژه و حساس قدرت بارورسازی اسپرم محسوب کرد و ممکن است در درون یک گونه مشخص ماهی نیز دارای اختلافات چشمگیر باشد. با این حال، زمانی که تخم‌ها با یک حجم ثابت منی لقاح داده می‌شوند و هدف، آنالیز قدرت بارورسازی نمونه‌های مختلف منی باشد (مانند مطالعه حاضر) تراکم اسپرماتوزا به عنوان یک ویژگی مهم مطرح است (Rurangwa *et al.*, 2004).

در این پژوهش، ضریب همبستگی پیرسون، میان عوامل کیفی اسپرم ماهیان قزل آلالی رنگین کمان با میزان مشارکت مولدین نر در تولید نتاج، نشان‌دهنده همبستگی مثبت میان مدت زمان تحرک اسپرم با میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج بود ($r=0.857$, $n=30$, $P<0.01$). همچنین، مولدین نری که دارای مدت زمان تحرک بیشتری هستند، در مقایسه با اسپرم مختلط و سایر نرها، دارای قدرت لقاح بیشتری بودند. اگر چه این اختلاف مشاهده شده در میزان لقاح از نظر آماری معنی دار نبود ولی نتاج حاصل از ردیابی نتاج در تیمار اسپرم مختلط (با استفاده از دو آغازگر چندشکل OMM1036 و Ocl8 به ترتیب ۵۶ و ۴۸ درصد لاروها مربوط به نر شماره ۲ بودند) این مسأله را تأیید نمود که بیشتر نتاج، حاصل از لقاح مولد نر شماره ۲ با تخمک‌های مورد استفاده هستند. مروری بر مطالعات انجام شده در زمینه بررسی همبستگی مدت زمان تحرک اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر در تولید نتاج، نشان‌دهنده برخی تناقضات در نتایج به دست آمده در گونه‌های مختلف است. در قزل آلالی رنگین کمان

مؤثر در رسیدن به درصد بالای ردیابی در تیمارها بود. از عوامل مهم دیگر در رسیدن به درصد قدرت ردیابی بالا در بررسی حاضر، می‌توان به وجود آلل‌های منحصر به فرد در دو جایگاه ژنی چندشکل استفاده شده اشاره نمود.

Hara و Sekino (۲۰۰۳) در گونه فلاندر ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) و Ribeiro و همکاران (۲۰۰۸) در ماهی آزاد اقیانوس اطلس به وجود آلل‌های منحصر به فرد در ژنوتیپ مولدین و عدم وجود آلل‌های خاموش در جایگاه‌های ژنی ریزماهوره مورد استفاده در تعیین ژنوتیپ مولدین به عنوان عوامل مهم در موفقیت آنالیز ردیابی مولدین و فرزندان اشاره کردند.

در این بررسی، تراکم اسپرم نر شماره ۳ به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) بیش از سایر تیمارها بود، با این حال، این نر سهم کمتری در تولید نتاج داشت. نتایج همبستگی بین تراکم اسپرم با میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج نیز منفی و معنی‌دار بود ($n=30$ ، $r=-0/915$ ، $P < 0/01$)، که مؤید عدم وجود ارتباط بین تعداد اسپرم و میزان مشارکت در تولید نتاج است. همبستگی منفی و معنی‌دار یعنی اینکه با افزایش تعداد اسپرم‌ها مشارکت کاهش یافته است. Gage و همکاران (۲۰۰۴) اظهار داشتند که احتمال تماس تخمک با اسپرم تحت تأثیر عواملی از جمله تعداد، سرعت و مدت زمان ماندگاری اسپرم است که ماهیان بر اساس اهمیت این شاخص‌ها خود را با شرایط متغیر وفق داده، به رقابت می‌پردازند. همچنین، Stoltz و Neff (۲۰۰۶) بیان کرده‌اند که اختلاف در تأثیر تعداد اسپرم بر روی موفقیت لقاح ممکن است به شرایط بوم‌شناختی گونه‌ها مرتبط باشد. برای مثال، ماهی آزاد بیشتر در آب‌های

ردیابی والدین و فرزندان، Perez-Enrique و Tanigushi در سال ۱۹۹۹ والدین بیش از ۷۳ درصد از لاروهای تشکیل شده در لقاح مخلوط ماهی باس دریایی قرمز (*Pagrus major*) را با استفاده از چهار الی پنج جایگاه ژنی ریزماهوره تعیین نمودند.

Hara و Sekino (۲۰۰۳) میزان ۸۶ درصد از موفقیت را برای ردیابی والدین در لقاح مخلوط دوازده مولد ماده و شش مولد نر کفشک ماهی ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) با استفاده از چهار جایگاه ژنی ریزماهوره گزارش کردند. در ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*) میزان موفقیت در ردیابی مولدین از ۴۰/۵ تا ۸۰/۹ درصد با استفاده از هشت جایگاه ژنی ریزماهوره در ۲۵ تا ۳۴ مولد مورد استفاده متغیر بود (Borrell et al., 2004). Vandeputte و همکاران (۲۰۰۴) موفقیت ردیابی ۹۵/۳ درصد را در ماهی کپور معمولی با استفاده از هشت جایگاه ژنی ریزماهوره گزارش کردند. در سال ۲۰۰۷ نیز Kim و همکاران انتساب ۸۴/۴ تا ۱۰۰ درصد از لاروهای تولید شده از لقاح مخلوط ماهی کفشک قهوه‌ای (*Pleuronectes herzensteini*) را به والدین تشکیل‌دهنده با استفاده از پنج جایگاه ژنی ریزماهوره انجام دادند. استفاده از نشانگرهای ریزماهوره دارای بیشترین تنوع ژنتیکی و بیشترین قدرت ردیابی والدین در قزل‌آلای رنگین‌کمان، بر اساس آنالیز اولیه نشانگرهای ریزماهوره استفاده شده در آزاد ماهیان صورت پذیرفت. این موضوع نقش زیادی در موفقیت بالای این تکنیک در گونه مورد مطالعه داشت. عدم وجود آلل‌های خاموش در جایگاه‌های ژنی ریزماهوره استفاده شده در مولدین و لاروها نیز از جمله دلایل

اسپرم در عملیات لقاح است و هیچ گونه رابطه معنی داری میان موفقیت بارورسازی با تعداد نسبی و طول کل اسپرم دیده نشد. سرعت خطی اسپرم دارای ارتباط مثبت و حرکت خطی اسپرم دارای ارتباط معکوس با موفقیت بارورسازی است. Aas و همکاران (۱۹۹۱) گزارش دادند که در ماهی آزاد اقیانوس اطلس با افزایش تراکم اسپرم، میزان لقاح نیز افزایش می یابد ولی در این مطالعه، میزان مشارکت والدین در ایجاد نتاج، بررسی نشده بود. در تحقیق حاضر، تراکم اسپرم تعیین کننده میزان موفقیت مولدین نر در تولید نتاج نبوده است. این نتیجه در تناقض با تئوری رقابت (Parker, 1990; Ball and Parker, 1998) و گزارش Neff و همکاران (۲۰۰۳) در خورشید ماهی آبشش آبی (*Lepomis macrochirus*) و همچنین، گزارش Snook (۲۰۰۵) در خصوص عدم تأثیر تعداد اسپرم بر رقابت اسپرم است. در تطابق با نتایج مطالعه حاضر، در ماهی آزاد اقیانوس اطلس (Gage et al., 2004) نیز، تعداد اسپرم عامل مشخص کننده موفقیت مولدین نر در ایجاد نتاج نبوده است. در ماهی قزل آلالی رنگین کمان نیز تراکم اسپرم رابطه منفی با میزان مشارکت مولدین نر در لقاح تخمک ها داشته است (Tuest et al., 2008). تعداد اسپرم زمانی در موفقیت بارورسازی مهم است که رقابت اسپرم از یک فرآیند بخت آزمایی پیروی کند. در بخت آزمایی، قدرت بارورسازی هر ماهی نر در ارتباط با تعداد اسپرم هایی است که در رقابت شرکت دارند (Parker, 1990). برای مثال، در ماهی آبشش آبی (*Lepomis macrochirus*)، آزمون های لقاح در شرایط آزمایشگاهی که در آن رقابت میان جفت نرها مورد بررسی قرار داده شدند، نشان داد که با

جاری تخم ریزی می کند در حالی که ماهی آبشش آبی در آب های ساکن دریاچه ها تخم ریزی می کند. بنابراین، شاید در آب های جاری اسپرم های سریع تر و در آب های ساکن تعداد اسپرم ها در رقابت دارای اهمیت باشد. Butts و همکاران (۲۰۰۹) نیز معتقدند که تعداد اسپرم مورد نیاز برای لقاح موفق ماهیان استخوانی متفاوت و وابسته به گونه است و به دلایلی از جمله سیستم تخم ریزی و لقاح، رفتارهای تخم ریزی و ویژگی های گامت ها برای نفوذ به میکروپیل اشاره کرده اند. لذا، نتایج به دست آمده از میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج، نشان دهنده این مطلب است که نر شماره ۳ در مقایسه با دیگر ماهیان مولد نر از قابلیت رقابت و بارور کنندگی کمتری برخوردار بوده است. از آنجا که ممکن است شاخص های دیگر اسپرم شناختی از جمله سرعت شنای اسپرم، مدت زمان تحرک و درصد اسپرم های متحرک الزاماً بالا نباشد و نقش این شاخص ها چشمگیرتر باشد (Gage et al., 2004)، این نتیجه می تواند بدین معنی باشد که تعداد اسپرم ممکن است دارای ارتباط معنی داری با موفقیت لقاح باشند ولی نمی توانند به عنوان شاخصی مناسب برای پیش بینی قدرت بارورسازی اسپرم قزل آلالی رنگین کمان مطرح باشند. در مطالعه Ottesen و همکاران (۲۰۰۹)، در آزمایش رقابت اسپرم در ماهی هالیوت اقیانوس اطلس نیز نتایج مشابهی به دست آمد، به طوری که مولدی که دارای بیشترین تراکم اسپرم بود، دارای مشارکت کمتری در ایجاد نتاج بوده است. Gage و همکاران نیز در سال ۲۰۰۴ با استفاده از انگشت نگاری DNA ریزماهواره ها در ماهی آزاد اقیانوس اطلس نشان دادند که سرعت نسبی اسپرم، عامل اصلی تعیین کننده برتری

نکته دلالت دارد که استفاده از لقاح یک به یک مولدین نر و ماده و مخلوط نمودن و توزیع تخم‌های لقاح یافته در انکوباتورها باعث فراهم نمودن فرصت یکسان برای همه مولدین نر مورد استفاده خواهد شد تا اطلاعات ژنتیکی خود را به فرزندان انتقال دهند (Ribolli and Zaniboni-Filho, Campton, 2004) (2009).

نتایج این مطالعه نشان داد که تحت شرایط آزمایشگاهی، مدت زمان تحرک اسپرم به عنوان یک عامل کلیدی در موفقیت رقابت اسپرم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مطرح است. همچنین، مشخص شد اگر چه شاخص‌های مرتبط با تحرک اسپرم تا حدودی مشخص‌کننده میزان لاروهای منتسب به نر شماره ۲ باشند، با این وجود، در هر دو گروه تیمارهای تک‌والدی و مختلط، هنگامی که میزان مناسب اسپرم به ازای تخمک (10^7) استفاده شد، درصد موفقیت لقاح بالا ($>95\%$) بود و موفقیت لقاح به استفاده از اسپرم یک یا چند ماهی نر بستگی نداشت. استفاده غیرضروری از ترکیب اسپرم چندین ماهی در طی لقاح ممکن است منجر به نتایج ناخواسته و مشارکت تعداد اندکی از مولدین در ایجاد جمعیت شود. اختلاط اسپرم چند ماهی نر بدون آگاهی دقیق از شاخص‌های تحرک اسپرم در نهایت، می‌تواند منجر به تنوع ژنتیکی پایین، هم‌خونی و ایجاد نژادهای با شایستگی اندک شود.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر به جهت پشتیبانی مالی این پژوهش طی پژوهانه شماره ۱۲-۱/۴-پ مورخ ۸۹/۴/۱۵ تقدیر و تشکر می‌شود.

افزایش تعداد اسپرم ماهی نر، مشارکت در ایجاد نتاج آن ماهی نیز افزایش دارد (Neff *et al.*, 2003). دلیل اصلی که می‌توان برای بروز پدیده رقابت اسپرم در میان مولدین نر و کاهش اندازه جمعیت مؤثر مولدین و نتیجتاً کاهش سطح تنوع ژنتیکی در گونه‌هایی مثل ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان اشاره کرد، اتخاذ الگوی نامناسب در مراکز تکثیر مصنوعی است. بر اساس نتایج الگوهای متفاوت لقاح که در تیمارهای اصلی و شاهد این تحقیق بررسی شدند، می‌توان اذعان نمود که انجام لقاح یک به یک مولدین نر و ماده که به صورت تصادفی انتخاب می‌شوند گزینه مناسبی برای بهره‌گیری از تمام ظرفیت مولدین موجود در انتقال ذخیره ژنتیکی لاروهاست. لقاح یک به یک مولدین نر و ماده و توزیع یکنواخت تخم‌های لقاح یافته در انکوباتورها، مشارکت ژنتیکی مولدین خصوصاً مولدین نر را در تولید لاروها نسبت به شیوه لقاح مخلوط گامت‌ها متعادل‌تر می‌نماید، از این رو، باعث افزایش اندازه جمعیت مؤثر در مولدین خواهد شد. البته استفاده از روش تلاقی‌های همگانی نیز به عنوان یکی از راه‌حل‌های بسیار مناسب مطرح است. در این روش، به منظور افزایش تنوع ژنتیکی، تمامی مولدین ماده با تمامی مولدین نر آمیزش می‌یابند. با فراهم آوردن چندین جفت برای هر کدام از ماهیان، به ویژه در مواردی که ناباروری وجود داشته باشد، بحران‌های موجود تعدیل می‌شوند. با اعمال این روش علیرغم آن که زاد و ولد کلی هر مولد ماده کاهش خواهد یافت، اما همه آنها در تولید نسل سهمیم هستند (Hallerman, 2003). تحقیقاتی که اخیراً به بررسی شیوه تکثیر مصنوعی مولدین پرداخته است نیز بر این

منابع

- سوری‌نژاد، ا. (۱۳۸۹) ارزیابی تأثیر رقابت اسپرم هنگام لقاح مخلوط گامت مولدان ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* بر میزان تنوع ژنتیکی نسل F1. پایان نامه دکتری، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
- علیزاده، م. (۱۳۸۶) برنامه راهبردی تحقیقات ماهیان سردآبی. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تنکابن.
- مهرابی، ی. (۱۳۸۱) بیهوشی و روش عمل تکثیر دو بار در سال ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. انتشارات اصلانی، تهران.
- Aas, G. H., Refstie, T. and Gjerde, B. (1991) Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture* 95: 125-132.
- Ball, M. A., and Parker G. A. (1998) Sperm competition games: a general approach to risk assessment. *Journal of Theoretical Biology* 194: 251-262.
- Birkhead, T. R. and Møller, A. P. (1998) Sperm competition and sexual selection. Academic Press, London.
- Birkhead, T. R., Martinez, J. G., Burke, T. and Froman, D. P. (1999) Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences* 266: 1759-1764.
- Borrell, Y. J., Álvarez, J., Vázquez, E., Pato, C. F. and Tapia, C. M. (2004) Applying microsatellites to the management of farmed turbot stocks (*Scophthalmus maximus* L.) in hatcheries. *Aquaculture* 241: 133-150.
- Butts, I. A., Trippel, E. A., and Litvak, M. K. (2009) The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod *Gadus morhua*. *Aquaculture* 286: 89-94.
- Buyukhatipoglu, S. and Holtz, W. (1984) Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture* 37: 63-71.
- Campton, D. E. (2004) Sperm competition in salmon hatcheries: the need to institutionalize genetically benign spawning protocols. *Transactions of the American Fisheries Society* 133: 1277-1289.
- Casselman, S. J., Schulte-Hostedde, A. I. and Montgomerie, R. (2006) Sperm quality influences male fertilization success in walley (*Sander vitreus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63: 2119-2125.
- Castro, J., Bouza, C., Presa, P., Pino-Querido, A., Riaza, A., Ferreiro, I., Sánchez, L. and Martínez, P. (2004) Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture* 242: 119-135.
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B and Volckaert, A. M. F. (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function. *Aquaculture* 255: 1-29.
- Dreanno, C., Suquet, M., Desbruyeres, E., Cosson, J., Delliou, H. and Billard, R. (1998) Effect of urine on semen quality in turbot, *Psetta maxima*. *Aquaculture* 169: 247-262.
- Gage, M. J. G., Macfarlane, C. P., Yeates, S., Ward, R. G., Searle, J. B. and Parker, G. A. (2004) Spermatozoa traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Current Biology* 14: 44-47.
- Geffen, A. J. and Evans, J. P. (2000) Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 182: 61-72.
- Hallerman, E. M. (2003) Population genetics: principles and applications for fisheries scientists. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.

- Hara, M and Sekino, M. (2000) Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture* 217: 107– 114.
- Herbinger, C. M., Roger, W. D., Pitman, R. P., Plaquet, D., Mesa, K. A., Morris, D. B., Wright, J. M. and Cook, D. (1995) DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture* 137: 245-256.
- Jackson, T. R., Martin-Robichaud, D. J. and Reith, M. E. (2003) Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock. *Aquaculture* 220: 245-259.
- Johnson, N. A., Rexroad III, C. E., Hallerman, E. M., Vallejo, R. L. and Palti, Y. (2007) Development and evaluation of a new microsatellite multiplex system for parental allocation and management of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstocks. *Aquaculture* 266: 53-62
- Kamler, E. (2005) Parent-egg-progeny relationships in teleost fishes: an energetic perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15: 399-421.
- Kim, S. G, Morishima, K., Satoh, N., Fujioka, T., Saito, A. and Arai, K. (2007) Parentage assignment in hatchery population of brown sole *Pleuronectes herzensteini* by microsatellite DNA markers. *Fisheries Science* 73: 1087-1093.
- McDonald, G. J., Danzmann, R. G. and Ferguson, M. M. (2004) Relatedness determination in the absence of pedigree information in three cultured strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 233: 65-78.
- McQuown, E. C., Sloss, B. L., Sheehan, R. J., Rodzen, J., Tranah, G. and May, B. (2000) Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon: new sturgeon primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser*. *Transactions of the American Fisheries Society* 139: 1380-1388.
- Nagler, J. J., Parsons, J. E. and Cloud, J. G. (2000) Single pair mating indicates maternal effects on embryo survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 184: 177-183.
- Neff, B. D., Fu, P. and Gross, M. R. (2003) Sperm investment and alternative mating tactics in bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral Ecology* 14: 634-641.
- Nilsson, E. and Cloud, J. G. (1992) Rainbow trout chimeras produced by injection of blastomeres into recipient blastulae. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 89: 9425-9428.
- Ottesen, O. H., Babiak, I. and Dahle, G. (2009) Sperm competition and fertilization success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 286: 240-245.
- Parker, G. A. (1990) Sperm competition games: raffles and roles. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences* 242: 120-126.
- Perez-Enrique, R. and Tanigushi, N. (1999) Use of microsatellite DNA as genetic tags for the assessment of a stock enhancement program of Red Sea bream. *Fisheries Science* 65: 374-379.
- Pourkazemi, M. (1996) Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the south Caspian Sea. Ph.D Thesis. University of Wales, Swansea.
- Ribeiro, Â., Morán, P. and Caballero, A. (2008) Genetic diversity and effective size of the Atlantic salmon *Salmo salar* L. inhabiting the River Eo (Spain) following a stock collapse. *Journal of Fish Biology* 72: 1933-1944.
- Ribolli, J. and Zaniboni-Filho, E. (2009) Individual contributions to pooled-milt fertilizations of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Neotropical Ichthyology* 7: 629-634.
- Rideout, R. M., Trippel, E. A. and Litvak, M. K. (2004) Paternal effects on haddock, *Melanogrammus*

- aeglefinus* L., early life history traits. *Journal of Fish Biology* 64: 695-701.
- Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F. and Nash, J. P. (2004) The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234: 1-28.
- Scott, A. P. and Baynes, S. M. (1980) A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology* 17: 707-739.
- Sekino, M., Sugaya, T., Hara, M. and Taniguchi, N. (2004) Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 233: 163-172.
- Snook, R. R. (2005) Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 46-53.
- Springate, J. R. C., Bromage, N. R., Elliot, J. A. K. and Hudson, D. L. (1984) The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eyeing, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture* 43: 313-322.
- Trippel, E. A. and Neilson, J. D. (1992) Fertility and sperm quality of virgin and repeatspawning Atlantic cod (*Gadus morhua*) and associated hatching success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49: 2118-2127.
- Tuest, V. M., Dietrich, G. J., Wojtczak, M., Slowinska, M., Moneserrat, J. D. and Cierreszko, A. (2008) Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology* 24: 393-397.
- Tvedt, H. B., Benfey, T. J., Martin-Robichaud, D. J. and Power, J. (2001) The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilisation success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture* 194: 191-200.
- Vandeputte, M., Kocour, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M., De Guerry, D., Rodina, M., Gela, D., Vallod, D., Chevassus, B. and Linhart, O. (2004) Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 235: 223-236.
- Williot, P., Kopeika, E. F. and Goncharo, B. F. (2000) Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). *Aquaculture* 189: 53-61.
- Wilson, A. J. and Ferguson, M. M. (2002) Molecular pedigree analysis in natural populations of fishes: approaches, applications and practical considerations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 1696-1707.