یکسان سازی غلظت اسپرم مولدین نرماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* در شیوه لقاح مخلوط و تأثیر آن بر تنوع ژنتیکی نسل F_1

ایمان سوری نژاد[۱و۲*]، محمد رضا کلباسی[۱]

۱.گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس
۲. ‘گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه هرمزگان

چکیده

در تکثیر مصنوعی مولدین ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius*، حفظ تنوع ژنتیکی بچه ماهیانی که برای بازسازی ذخایر استفاده می‌شوند نیازمند توجه جدی است. مشارکت نامتعادل مولدین نر و ماده در تولید آلوین-ها در شیوه فعلی تکثیر مصنوعی باعث کاهش اندازه جمعیت مؤثردر مولدین می‌گردد و یکسان نمودن حجم مایع منی نیز منجر به مشارکت متعادل مولدین در تولید آلوین‌ها نمی شود. با توجه به احتمال تأثیر غلظت اسپرم بر میزان مشارکت مولدین نر در تولید آلوین‌ها در تکثیر مصنوعی ماهی آزاد دریای خزر، اندازه جمعیت مؤثر مولدین و تنوع ژنتیکی نسل F_1در لقاح مخلوط شش مولد نر و دو مولد ماده با غلظت یکسان اسپرم و تعداد برابر تخمک بررسی شد. ردیابی والدین و نسل F1 با استفاده از روش حذف در نرم افزار FAP و پس از بررسی ۹ جایگاه ریزماهواره و انتخاب ۳ جایگاه Str ۵۸، Str ۷۳ و Str ۵۹۱ که دارای بیشترین میزان تنوع ژنتیکی در مولدین ماهی آزاد دریای خزر بودند صورت پذیرفت. بیش از۹۱درصد از آلوین‌های تولید شده به شیوه لقاح مخلوط به والدین خود منتسب شدند.اندازه جمعیت مؤثر مولدین ۵/۲۴ (۰/۶۵) محاسبه گردید و تعداد آلل¬ها و هتروزیگوسیتی مورد انتظار کاهش معنی¬داری را در آلوین¬ها (۶/۶۷ ±۰/۰۱۱ ۰/۷۲۶) نسبت به مولدین (۷/۳۳و ۰/۸۰۸) نشان دادند ($P<0/05$). بر اساس نتایج تحقیق حاضر یکسان¬سازی غلظت اسپرم مولدین نر در شیوه لقاح مخلوط باعث مشارکت متعادل مولدین نر در بارورسازی تخمک¬ها و عدم کاهش تنوع ژنتیکی در آلوین¬ها نمی-شود.

واژگان کلیدی: تکثیر مصنوعی، اندازه جمعیت مؤثر، ردیابی والدین، غلظت اسپرم، ریزماهواره، ماهی آزاد دریای خزر Salmo trutta caspius

* نویسنده مسوول، پست الکترونیک: i_sourinezhad@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

۱.مقدمه

افزایش فشار صیادی، نابودی مکان‌های تخم ریزی و تخریب زیستگاه‌ها طی دهه‌های اخیر منجر به کاهش شدید تکثیر طبیعی گونه بومی ماهی آزاد دریای خزر *Salmotruttacaspius* و قرارگیری آن در لیست قرمز IUCN شده است (Jalali and MojaziAmiri, 2009). شیلات ایران به منظور حفظ و بازسازی ذخایر ماهی آزاد، تکثیر مصنوعی مولدین به شیوه لقاح مخلوط[1] با ترکیب مایع منی ۳-۴ مولد نر با مخلوط تخمک همین تعداد مولد ماده و رهاسازی بچه ماهیان تولید شده را در دستور کار قرار داده است. اتخاذ شیوه لقاح مخلوط در تکثیر مصنوعی گونه‌هایی که برای بازسازی ذخایر طبیعی استفاده می‌شوند، کاهش اندازه جمعیت مؤثر N_e[2] (تعداد واقعی مولدینی است که در یک برنامه تکثیر از میان تعداد کل مولدین مورد استفاده[3] در تشکیل لاروها مشارکت می‌کنند) و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی در نسل F_1 را به دنبال دارد (Brown *et al*., 2005; Frost *et al*., 2006; Machado-Schiaffino *et al*., 2007). شایان ذکر است کاهش تنوع ژنتیکی منجر به اثرات بالقوه مضر روی ویژگی‌های عملکردی مختلف از جمله بازماندگی و رشد در ماهیان می‌گردد و استفاده از این ماهیان برای بازسازی ذخایر، کاهش تنوع ژنتیکی در جوامع طبیعی (Sourinejad *et al*., 2011؛ سوری نژاد و همکاران، ۱۳۸۹). افزایش میزان آمیزش خویشاوندی و در نهایت انقراض نسل آنها را به دنبال خواهد داشت (Machado-Schiaffino *et al*., 2007; Horreo *et al*., 2008).

با ظهور نشانگرهای ژنتیکی خصوصاً ریزماهواره-ها[4]، ردیابی مولکولی مولدین و تعیین میزان مشارکت آنها در تولید لاروها در شیوه لقاح مخلوط به دلیل توارث همبارز[5]، تنوع بالا و فراوانی در ژنوم تسهیل گردیده است و این گونه نشانگرها ابزار قدرتمندی برای مطالعات ردیابی والدین هستند (Jackson *et al*., 2003; Castro *et al*., 2007). نشانگرهای ریزماهواره به طور موفقیت آمیزی جهت بررسی میزان مشارکت واقعی مولدین و تعیین اندازه جمعیت مؤثر در چند گونه ماهی پرورشی از جمله باس آسیایی *Latescalarifer* (Frost *et al*., 2006)، کفشک سنگالی *Soleasenegalensis* (Porta *et al*., 2006)،آزادماهی اقیانوس اطلس *Salmosalar* (Horreo *et al*., 2008) و ماهی آزاد دریای خزر (Sourinejad *et al*., 2011) استفاده شده‌اند.

در ماهی آزاد دریای خزر، نتایج ردیابی مولکولی والدین و فرزندان با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره مؤید مشارکت بسیار نامتعادل مولدین در تولید آلوین‌ها در شیوه لقاح مخلوط بود. در این خصوص اختلافات زیادی خصوصاً در میزان مشارکت مولدین نر در تولید آلوین‌ها مشاهده گردید که کاهش اندازه جمعیت مؤثر در مولدین و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی در نسل بعد را به دنبال داشت. بنابراین بررسی بیشتر در مورد ارتباط بین خصوصیات اسپرم مولدین مورد استفاده و میزان مشارکت آنها در تولید آلوین‌ها به عنوان موضوع مهمی برای تحقیقات آینده در این زمینه ذکر گردید (Sourinejad *et al*., 2011؛ سوری نژاد و همکاران، ۱۳۸۹).

به نظر می‌رسد مشارکت مولدین نر در تولید لارو در شیوه لقاح مخلوط گامت‌ها، به خصوصیات اسپرم مولدین مورد استفاده از جمله حجم مایع منی، غلظت اسپرم و تحرک اسپرم بستگی داشته باشد ولی ارتباط این عامل با میزان موفقیت تولید مثلی مولدین نر هنوز به طور کامل مشخص نشده است و تناقض‌های زیادی در این زمینه به چشم می خورد (Kaspar*et al*., 2007; Wedekind *et al*., 2007). یکسان نمودن حجم مایع منی و تعداد تخمک نه تنها منجر به مشارکت متعادل مولدین در تولید آلوین‌ها در تکثیر

1.Mixed milt fertilization
2.Effective Population Size
3.Nc= Census size
4. Microsatellite
5. Codominant

Archive of SID

www.SID.ir

مصنوعی ماهی آزاد دریای خزر نگردید بلکه اختلافات زیادی در میزان مشارکت مولدین وبویژه جنس نر در تولید آلوین‌ها مشاهده شد. میزان N_e در تیمارهای مختلف از ۰/۵۱ تا ۰/۸۴ محاسبه گردید که کاهش معنی‌دار تنوع ژنتیکی در آلوین‌ها را بدنبال داشت ($P<۰/۰۵$) (سوری نژاد و همکاران، ۱۳۹۱).

با توجه به اینکه بررسی ارتباط بین میزان غلظت اسپرم و مشارکت مولدین در تولید آلوین‌ها در شیوه فعلی تکثیر مصنوعی ماهی آزاد تاکنون گزارش نگردیده است، لذا تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر یکسان سازی غلظت اسپرم مولدین نر بر میزان مشارکت آنها در تولید آلوین‌ها با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره و همچنین مقایسه تنوع ژنتیکی مولدین و آلوین‌های تولید شده از آنها در شیوه لقاح مخلوط با غلظت یکسان اسپرم به ازای هر مولد نر صورت پذیرفت.

۲. مواد و روش کار

تکثیر مولدین، تولید آلوین‌ها و نمونه‌برداری

تکثیر مولدین در کارگاه تکثیر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت و به روش لقاح خشک صورت پذیرفت. تخمک و اسپرم مورد نیاز از دو مولد ماده (۵۲/۶۵±۴/۸۵cm و ۱۳۵۰±۲۴۵/۶۰ gr) و شش مولد نر (۵۴/۱۷±۲/۷۶cm و ۱۹۸۳/۳۳±۲۱۲gr) ماهی آزاد که در فصل تکثیر از رودخانه چشمه کیله تنکابن صید شده بودند، استحصال گردید. یکسان-سازی غلظت اسپرم بر اساس نتایج سنجش غلظت اسپرم مولدین نرِ مورد استفاده انجام شد (Tvedt *et al*., 2001)(شکل ۱). با توجه به اینکه مقدار بهینه اسپرم برای تکثیر مصنوعی، ۱۰۰ هزار تا ۲۰۰ هزار اسپرم به ازای هر تخمک پیشنهاد شده است (Billard*et al*., 1995; Linhart *et al*., 2003) لذا جهت رسیدن به این نسبت، مقدار ۵ میکرولیتر مایع منی برای مولد نر شماره ۱ به عنوان مقدار پایه در نظر گرفته شد که موجب رسیدن این نسبت به ۱۳۰ هزار اسپرم به تخمک می‌شود. بر اساس مولد نر شماره یک و طبق فرمول C1V1= C2V2، مقدار ۷/۶۸ میکرولیتر از مایع منی برای مولد نر شماره ۲، مقدار ۷/۷۹ میکرولیتر از مایع منی برای مولد نر شماره ۳، مقدار ۹/۷۷ میکرولیتر از مایع منی برای مولد نر شماره ۴، مقدار ۸/۱۷ میکرولیتر از مایع منی برای مولد نر شماره ۵ و مقدار ۷/۳۳ میکرولیتر از مایع منی برای مولد نر شماره ۶ محاسبه گردید و با هم مخلوط شدند.

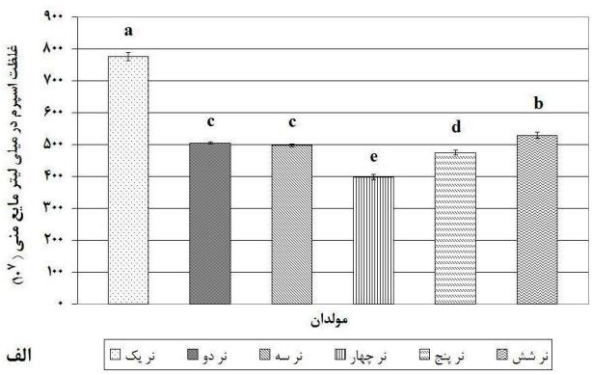
تعداد ۱۵۰ عدد از تخمک مولد ماده شماره ۱ و ۱۵۰ عدد از تخمک مولد ماده شماره ۲ نیز مخلوط شدند. در مرحله بعد مخلوط اسپرم مولدین نر به مخلوط تخمک مولدین ماده اضافه گردید و پس از عملیات لقاح، تخم‌های لقاح یافته تا مرحله جذب کامل کیسه زرده در آلوین‌های تفریخ شده، مورد انکوباسیون قرار گرفتند. جهت حصول اطمینان از کیفیت مناسب اسپرم و تخمک مولدین مورد استفاده و همچنین حصول اطمینان از میزان زنده مانی متعادل آلوین‌های تولید شده توسط هر مولد نر پس از مراحل جذب کیسه زرده یک تیمار شاهد نیز درنظر گرفته شد. طراحی تیمار شاهد به گونه‌ای بود که مولدین نر فرصت لقاح یک به یک با مولدین ماده را پیدا کنند تا نسبت به کیفیت اسپرم در آنها اطمینان حاصل شده و زنده مانی آلوین‌های تولید شده توسط آنها در لقاح یک به یک با مولدین ماده، مورد بررسی قرار گیرد.

تخمک و اسپرم مورد نیاز برای انجام تیمار شاهد از بین مولدین مورد استفاده در این تحقیق به طور تصادفی از یکی از مولدین ماده (شماره ۲) و سه مولد نر (شماره ۱، ۲ و ۳) با توجه به محدودیت مقدار اسپرم و تعداد تخمک در دسترس مولدین ماهی آزاد استحصال گردید. در این تیمار شاهد، ۶۰ عدد تخمک مولد ماده شماره دو با ۵ میکرولیتر مایع منی هر یک از سه مولد نر شماره ۱، ۲و ۳ به صورت انفرادی (یک ماده به یک نر) لقاح داده شد و تخم-

www.SID.ir

های لقاح یافته از سه خانواده، در تراف‌ها توزیع گردیدند.

پس از جذب کیسه زرده تعداد ۱۵ قطعه آلوین به ازای امکان تشکیل هر جفت تلاقی، نمونه برداری شده و در اتانول مطلق جهت مطالعات مولکولی تثبیت شدند. همچنین همزمان با زیست سنجی، بخشی از باله دمی مولدین جهت ردیابی مولکولی میزان قرابت آنها با فرزندان در اتانول تثبیت گردید . شمای کلی الگوی لقاح مولدین در جدول ۱ ارائه شده است.



الف

شکل ۱. غلظت اسپرم (تعداد در میلی‌متر مکعب مایع منی) در مولدین ماهی آزاد دریای خزر*Salmo trutta caspius* ، حروف غیر یکسان بیانگر وجود تفاوت در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ می‌باشد.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

استخراج DNA ژنومی از باله دمی مولدین و آلوین‌ها به روش استاندارد فنل-کلروفرم (Sambrook *et al*., 1989) انجام شد. مولدین با استفاده از ۹ جایگاه ریزماهواره که در اغلب مطالعات آزاد ماهیان پلی‌مورفیسم بیشتری را نشان داده اند تعیین ژنوتیپ گردیدند (جدول ۲).نهایتاً ۳ جایگاه Str ۵۸، Str ۷۳ و Str ۵۹۱که نسبت به سایرین میزان بالاتری از تنوع ژنتیکی و وجود آلل‌های یگانه (Unique alleles) را در مولدین ماهی آزاد دریای خزر نشان دادند برای آنالیز ردیابی انتخاب شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از ۳۰ نانوگرم DNA در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر برای هر واکنش و میزان هر پرایمر ۰/۶۶µM، مقدار dNTP برابر با ۱۰۰µM، PCR buffer با غلظت ۱ X ،MgCl2 برابر با ۱/۵ mM و Taq DNA polymerase ساخت شرکت اینویتروژن آمریکا برابر با ۰/۵ U و با تنظیم دمای الحاق (جدول ۲) و برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر (MJ research PTC-100) ساخت کشور آمریکا (جدول ۳) بهینه گردید. مولدین و آلوین‌ها در جایگاه‌های ریزماهواره با دستگاه توالی یاب خودکار ABI PRISM® 3730 (Applied Biosystems) تعیین ژنوتیپ شدند و امتیازدهی به آلل‌ها با نرم افزار GeneMapper نسخه ۴ انجام شد.

ردیابی والدین و اندازه جمعیت مؤثر

پارامترهای تنوع ژنتیکی (تعداد آلل‌ها N.A.[1]، هتروزیگوسیتی مورد انتظار He[2] و مشاهده شده Ho[3]، ظرفیت اطلاعات پلی‌مورفیسم (PIC[4]) و فراوانی آلل‌های خاموش (NU.) برای هر جایگاه ریزماهواره در ۸ مولد مورد تحقیق با استفاده از نرم افزار Cervus نسخه ۳ محاسبه شد (Kalinowski *et al*., 2007). از این نرم‌افزار همچنین برای تعیین قدرت ردیابی والدین هنگامی که اطلاعات ژنتیکی یکی از والدین موجود نباشد (Excl1) و یا اطلاعات ژنتیکی هر دو والد موجود باشد (Excl2) استفاده شد. قدرت ترکیبی ردیابی والدین (CPE[5]) در مجموع جایگاه‌ها برای Excl1 و Excl2 نیز طبق روابط A و B محاسبه شد (Vandeputte *et al*., 2004).

رابطه A:

مقدار PE هر جایگاه=

قدرت ردیابی هر جایگاه (Excl) منهای عدد یک

رابطه B:

مقدار CPE=

حاصلضرب PE تمام جایگاه¬های مورد مطالعه منهای عدد یک

1. Number of alleles
2. Expected Heterozygosity
3. Observed Heterozygosity
4. Polymorphic Information Content
5. Combined Probability of Exclusion

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. الگوی کلی لقاح مولدین ماهی آزاد دریای خزر *Salmotruttacaspius* در تیمارهای مختلف تحقیق حاضر

تیمار	نحوه اختلاط گامت ها	نر شماره:	ماده شماره:	تعداد آلوین نمونه برداری شده (۲ تکرار)		حجم مایع منی و تعداد تخمک به ازای هر مولد
تیمار اول	♀۲ * ♂۶	۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶	۲ و ۳	۳۶۰		تعداد اسپرم یکسان، ۱۵۰ عدد تخمک
تیمار شاهد	♀۱ * ♂۱	۱	۲	مخلوط نمودن ۳ خانواده	۱۰۰	۵ میکرولیتر مایع منی، ۶۰ عدد تخمک
	♀۱ * ♂۱	۲	۲			
	♀۱ * ♂۱	۳	۲			

جدول ۲. جایگاه‌های ریزماهواره استفاده شده برای آنالیز اولیه و تعیین ژنوتیپ مولدین ماهی آزاد دریای خزر*Salmotruttacaspius*

جایگاه ریزماهواره	ترادف	شماره بانک ژنی یا مرجع	دمای الحاق (^{o}C)
Ssa ۸۵	5'-AGGTGGGTCCTCCAAGCTAC-3' 5'-ACCCGCTCCTCACTTAATC-3'	U43692	**۶۰**
Str ۶۰	5'-CGGTGTGCTTGTCAGGTTTC-3' 5'-GTCAAGTCAGCAAGCCTCAC-3'	(Estoup *et al*., 1996)	**۶۰**
Str ۱۵	5'-TGCAGGCAGACGGATCAGGC-3 5'-AATCCTCTACGTAAGGGATTTGC-3'		**۵۸**
Str ۷۳	5'-CCTGGAGATCCTCCAGCAGGA-3' 5'-CTATTCTGCTTGTAACTAGACCTA-3'		**۵۸**
Str ۵۸	5'-AACAATGACTTTCTCTGAC-3 5'-AAGGACTTGAAGGACGAC-3'	U60223	**۵۶**
Str ۸۵	5'-GGAAGGAAGGGAGAAAGGT-3' 5'-GGAAAATCAATACTAACAA-3'	(Presa and Guyomard, 1996)	**۵۵**
Str ۵۴۳	5'-ATTCTTCGGCTTTCTCTTGC-3' 5'-ATCTGGTCAGTTTCTTTATG-3'		**۵۵**
Str ۵۹۱	5'-CTGGTGGCAGGATTTGA-3' 5'-CACTGTCTTTCGTTCTT-3'		**۵۵**
SsoSl ۴۳۸	**5'-GACAACACACAACCAAGGCAC-3' 5'-TTATGCTAGGTCTTTATGCATTGT-3'**	**Z49134**	**۵۵**

جدول ۳ . برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر DNA به روش ریزماهواره

مراحل PCR	دما (درجه سانتیگراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشته سازی اولیه	۹۵	۱۰ دقیقه	**۱**
واسرشته سازی	۹۴	۴۵ ثانیه	**۳۵**
الحاق	۶۰-۵۵	۵۰ ثانیه	
بسط	۷۲	۵۰ ثانیه	
بسط نهایی	**۷۲**	**۱۰ دقیقه**	**۱**

www.SID.ir

ردیابی والدین بر اساس روش حذف[17] و با استفاده از ۳ جایگاه دارای بیشترین قدرت ردیابی از طریق نرم افزار FAP نسخه ۳/۵ انجام گردید (Taggart, 2007). بر پایه اطلاعات نرم‌افزار فوق، تعداد آلوین‌های تولید شده توسط هر مولد ماده و نر در هر تیمار تعیین شده و سپس درصد مشارکت هر مولد در تولید آلوین‌ها محاسبه شد. از آزمون مربع کای جهت تعیین میزان انحراف تعداد آلوین‌های تولید شده توسط هر مولد ماده و نر هم به طور کلی و هم در خصوص هر جفت مولد ترکیب شده، از فرض اولیه مشارکت متعادل در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد. برای محاسبه N_e از رابطه C استفاده گردید. در این رابطه n تعداد آلوین نمونه برداری شده، Ks و Kd میانگین تعداد آلوین تولید شده توسط مولدین نر و ماده و Vs و Vd واریانس تعداد آلوین تولید شده توسط مولدین نر و ماده می‌باشند (Vandeputte *et al*., 2004).

رابطهC:

$$(N_e)\ ۴=(n\ -۲)/\ ((Ks+Vs\ /Ks)$$
$$+(Kd+Vd\ /Kd)\ ۲)-$$

از آزمون T-test جهت بررسی معنی‌داری تفاوت بین مولدین و آلوین‌ها از نظر پارامترهای تنوع ژنتیکی در میانگین جایگاه‌ها استفاده گردید (Horreo *et al*., 2008).

۳. نتایج

درصد لقاح و میزان تفریخ

میانگین درصد لقاح در تحقیق حاضر ۱/۲±۹۲ درصد در تیمارها محاسبه شد. چشم زدگی تخم‌های لقاح یافته در دمای ۷ درجه سانتیگراد ۳۲ روز (۲۲۴ درجه روز) و تفریخ تخم‌های چشم زده ۳۰ روز (۲۱۰ درجه روز) به طول انجامید و با موفقیت ۱/۷±۹۰ درصد همراه بود. جذب کامل کیسه زرده نیز در آلوین‌های تفریخ شده ۲۱۷ درجه روز طول کشید. درصد بالای لقاح و تفریخ بیانگر رسیدگی مناسب مولدین و موفقیت عمل تکثیر و همچنین شرایط مساعد دمایی و مکانی در انکوباسیون تخم‌ها بود.

تنوع ژنتیکی مولدین ماهی آزاد

نتایج آنالیز تنوع ژنتیکی مولدین با استفاده از نه جایگاه ریزماهواره نشان داد که .N.A از یک آلل در جایگاه۶۰ Str تا نه آلل در جایگاه‌های۵۸ Str و ۵۹۱ Str و در مجموع با میانگین ۴/۳۳ آلل متغیر بود (جدول ۴). هتروزیگوسیتی مشاهده شده دامنه‌ای بین ۰/۰ در جایگاه۶۰ Str و ۱ درجایگاه ۵۸ Str و Str۵۹۱ داشت. He از ۰/۰ در جایگاه۶۰ Str تا ۰/۹۰۰ در جایگاه ۵۸ Str متغیر بود. جایگاه۶۰ Str در سایر مطالعات آزاد ماهیان نیز پلی‌مورفیسم کمتری را نسبت به سایر جایگاه‌های متداول ریزماهواره نشان داده‌اند. بر اساس نتایج تجزیه تنوع ژنتیکی مولدین، سه جایگاه ۵۸ Str، ۷۳ Str و ۵۹۱ Str جهت ردیابی مولدین و آلوین‌ها انتخاب شدند. در خصوص این سه جایگاه ریز ماهواره منتخب، میانگین .N.A و He به ترتیب ۷/۳۳ و ۰/۸ محاسبه گردید. نتایج تخمین فراوانی آلل‌های خاموش با استفاده از نرم افزار Cervus نسخه ۳ در همه جایگاه‌ها منفی بود (جدول ۴).

ردیابی مولکولی مولدین و آلوین‌ها

قدرت ترکیبی ردیابی والدین و فرزندان برای مجموع جایگاه‌ها ۰/۹۰۳ (Excl1) و ۰/۹۸۳ (Excl2) و برای سه جایگاه انتخاب شده ۰/۸۰۸ (Excl1) و ۰/۹۳۲ (Excl2)محاسبه گردید. آنالیز ردیابی والدین، جفت مولد نر و ماده تشکیل دهنده بیش از ۹۱٪ آلوین‌ها را با استفاده از نرم افزار FAP مشخص ساخت.

مشارکت مولدین در تولید آلوین‌ها و اندازه جمعیت مؤثر

میزان کلی مشارکت در تولید آلوین‌ها در بین مولدین نر (x^2=۱۴۵/۴۱۴، P<۰/۰۰۱) و در بین

17. Exclusion

Archive of SID

www.SID.ir

مولدین ماده (x^2 =۴/۴۰۲، P =۰/۰۳۶) به طور معنی‌داری متفاوت بود. در بین شش مولد نر، مولد نر شماره پنج حدود ۳۴ درصد از آلوین‌ها را تولید نمود. در خصوص دو مولد ماده نیز مولد شماره دو حدود ۵۶ درصد و مولد شماره یک حدود ۴۴ از آلوین‌ها را تولید کردند (شکل ۲). همچنین میزان مشارکت مولدین ماده در ترکیب با مولد نر شماره ۱ (x^2=۲/۸۸، P<۰/۰۰۹)، مولد نر شماره ۲ (x^2 =۱/۶۵، P=۰/۲۰)، مولد نر شماره ۳ (x^2=۰/۲۶، P=۰/۶۱)، مولد نر شماره ۴ (x^2 =۰/۵۷، P=۰/۴۵)، مولد نر شماره ۵ (x^2 =۳/۲۵، P=۰/۰۷) و مولد نر شماره ۶ (x^2 =۰/۶۱، P=۰/۴۳) تفاوت معنی‌داری نداشت اما میزان مشارکت مولدین نر در تولید آلوین‌ها در ترکیب با مولد ماده شماره ۱ (x^2 =۷۸/۷۴، P=۰/۰) و مولد ماده شماره ۲ (x^2 =۷۲/۹۷، P=۰/۰) به طور معنی‌داری متفاوت بود. تفاوت در میزان مشارکت مولدین ماده و نر در تولید آلوین‌ها باعث کاهش N_e به ۵/۲۴ در مقایسه با N_c برابر با ۸ گردید.

در تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری در میزان مشارکت جفت مولدینی که به صورت مجزا لقاح داده شده بودند در تولید آلوین‌ها وجود نداشت (P>۰/۰۵)(شکل ۳). با توجه به نتایج حاصل از تیمار شاهد، نسبت به توانایی اسپرم مولدین نر در لقاح دادن تخمک‌ها و کیفیت مناسب تخمک‌مولدینبا توجه به میانگین درصد لقاح، چشم زدگی و تفریخ بالای ۹۰ درصد تیمار شاهد اطمینان حاصل گردید.

مقایسه تنوع ژنتیکی در مولدین و آلوین-های تولید شده

تعداد آلل‌ها، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و محتوای اطلاعات پلی مورفیسم در مولدین و آلوین‌ها در جدول ۵ ارائه گردیده است.تعداد آلل‌ها بین مولدین و آلوین‌ها در دو لوکوس Str ۵۸ و Str ۷۳ یکسان بود ولی در لوکوس Str ۵۹۱ در آلوین‌ها کاهش داشت. هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده و محتوای اطلاعات پلی مورفیسم در هر سه لوکوس در آلوین‌ها نسبت به مولدین کاهش معنی داری نشان داد (P<۰/۰۵). در تیمار شاهد تعداد آلل‌ها بین مولدین و آلوین‌ها در هر سه لوکوس Str ۵۸، Str ۷۳ و Str ۵۹۱ یکسان بود. هتروزیگوسیتی مورد انتظار، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و محتوای اطلاعات پلی‌مورفیسم نیز در هر سه لوکوس ریزماهواره مورد بررسی در آلوین‌ها نسبت به مولدین تفاوت معنی-داری نداشت (P>۰/۰۵).

۴. بحث و نتیجه گیری

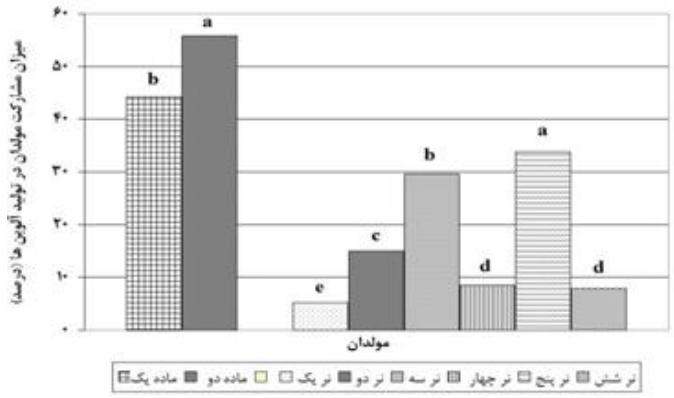
حفاظت از ذخایر ژنتیکی آبزیان از طریق ردیابی مولکولی مولدین و لاروهای تولید شده با نشانگرهای ریزماهواره در دهه گذشته رشد چشمگیری داشته است. استفاده از تعداد حداقل نشانگرهای ریزماهواره و در عین حال دست‌یابی به درصد بالای موفقیت در مشخص نمودن مولدین مشارکت کننده در تولید لاروها در شیوه لقاح مخلوط گامت‌ها از اهداف عمده برنامه‌هایی است که تکنیک ردیابی والدین و فرزندان را به کار می برند (Castro*et al*., 2007؛ Martinez and Fernandez, 2009).در تحقیق حاضر، استفاده از تنها سه جایگاه ریزماهواره، با میزان بالایی از قدرت ردیابی والدین در ماهی آزاد دریای خزر همراه بود و بیش از ۹۱ درصد از آلوین‌ها در نرم افزار FAP به والدین خود منتسب شدند. در میان گزارش‌های منتشر شده در زمینه استفاده از جایگاه‌های ریزماهواره برای ردیابی والدین و فرزندان، در سال ۲۰۰۳، Hara و Sekino میزان ۸۶ درصد موفقیت را برای ردیابی والدین در لقاح مخلوط دوازده مولد ماده و شش مولد نر ماهی فلاندر ژاپنی با استفاده از چهار جایگاه ریزماهواره 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 *Pleuronectesherzensteini* را به والدین تشکیل دهنده با استفاده از پنج جایگاه ریزماهواره انجام دادند.

Archive of SID
www.SID.ir

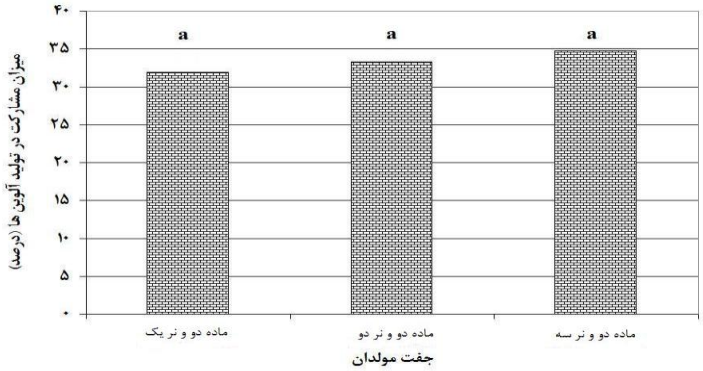
جدول ۴ تخمین پارامترهای تنوع ژنتیکی در مولدین ماهی آزاد دریای خزر *Salmotruttacaspius* با استفاده نرم افزار CERVUS نسخه ۳

آغازگر	تعداد آلل	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	پلی مورفیسم	Excl1	Excl2	آلل خاموش
Str15	۳	۰/۸۷۵	۰/۵۷۵	۰/۴۴۷	۰/۱۴۵	۰/۲۵۲	-۰/۲۶۹
Str58*	۹	۱	۰/۹۰۰	۰/۸۲۶	۰/۵۲۶	۰/۶۹۲	-۰/۰۷۷
Str60	۱	–	–	–	–	–	–
Str73*	۴	۰/۷۵۰	۰/۶۴۲	۰/۵۲۵	۰/۱۹۰	۰/۳۲۵	-۰/۰۹۳
Str85	۲	۰/۱۲۵	۰/۱۲۵	۰/۱۱۰	۰/۰۰۷	۰/۰۵۵	-۰/۰۴۶
Ssa85	۴	۰/۸۷۵	۰/۷۷۵	۰/۶۷۵	۰/۳۰۱	۰/۴۷۲	-۰/۰۴۰
SsoSl438	۲	۰/۱۲۵	۰/۱۲۵	۰/۱۱۰	۰/۰۰۷	۰/۰۵۵	-۰/۰۱۶
Str543	۵	۰/۶۲۵	۰/۵۳۳	۰/۴۷۴	۰/۱۳۹	۰/۳۰۶	-۰/۱۵۲
Str591*	۹	۱	۰/۸۸۳	۰/۸۱۰	۰/۵۰۰	۰/۶۷۱	-۰/۰۵۳
مجموع	۴/۳۳	۰/۵۹۷	۰/۵۰۶	۰/۴۴۲	–	–	
جایگاه منتخب	۷/۳۳	۰/۹۱۶	۰/۸۰۸	۰/۷۲۰	–	–	

*جایگاه‌های منتخب با علامت ستاره مشخص شده‌اند.



شکل ۲.مشارکت مولدین ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* در تولید آلوین‌ها. حروف غیر یکسان بیانگر وجود تفاوت در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ می‌باشد.



شکل ۳. مشارکت مولدین ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* در تولید آلوین‌ها در تیمار شاهد. حروف یکسان بیانگر عدم وجود تفاوت در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ می‌باشد.

www.SID.ir

جدول ۵ مقایسه تنوع ژنتیکی مولدین و آلوین‌های ماهی آزاد دریای خزر *Salmotruttacaspius* با سه جایگاه منتخب ریزماهواره

شاخص	جایگاه / تیمار	Str ۵۸		Str ۷۳		Str ۵۹۱		میانگین	
		Br.	Al.	Br.	Al.	Br.	Al.	Br.	Al.
N.A	تیمار اول	۹	۹	۴	۴	۹	۷	۷/۳۳	۶/۶۷
	تیمار شاهد	۶	۶	۲	۲	۸	۸	۵/۳۳	۵/۳۳
He	تیمار اول	۰/۹۰۰	۰/۸۵۵	۰/۶۴۲	۰/۵۵۹	۰/۸۸۳	۰/۷۶۵	^{a}۰/۸۰۸	^{b}۰/۷۲۶±۰/۰۱۱
	تیمار شاهد	۰/۹۲۹	۰/۹۱۹	۰/۵۳۶	۰/۵۲۸	۱/۰	۰/۹۹۲	^{a}۰/۸۲۲	^{a}۰/۸۱۳±۰/۰۰۷
Ho	تیمار اول	۱	۰/۹۶۳	۰/۷۵۰	۰/۶۱۰	۱/۰	۰/۸۳۵	^{a}۰/۹۱۷	^{b}۰/۸۰۳±۰/۰۱۲
	تیمار شاهد	۱	۱/۰	۰/۷۵۰	۰/۷۴۳	۱/۰	۱/۰	^{a}۰/۹۱۷	^{a}۰/۹۱۴±۰/۰۰۱
PIC	تیمار اول	۰/۸۲۶	۰/۸۳۵	۰/۵۲۵	۰/۵۰۵	۰/۸۱۰	۰/۷۳۸	^{a}۰/۷۲۰	^{b}۰/۶۹۳±۰/۰۰۷
	تیمار شاهد	۰/۷۸۶	۰/۷۷۹	۰/۳۵۹	۰/۳۵۷	۰/۸۶۱	۰/۸۵۸	^{a}۰/۶۶۹	^{a}۰/۶۶۵±۰/۰۰۲

*N.A.تعداد آل‌ها، He و Ho هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده و PIC ظرفیت اطلاعات پلی مورفیسم، Br: مولدین، Al: آلوین‌ها

شناسایی و استفاده از جایگاه‌های ریزماهواره دارای بیشترین تنوع ژنتیکی و بیشترین قدرت ردیابی والدین در ماهی آزاد که بر اساس آنالیز اولیه جایگاه-های ریزماهواره مورد استفاده در آزاد ماهیان صورت پذیرفت نقش زیادی در موفقیت بالای این تکنیک در گونه مورد تحقیق داشت. عدم وجود آلل‌های خاموش در جایگاه‌های ریزماهواره استفاده شده در مولدین و آلوین‌ها که نتایج بررسی پارامترهای تنوع ژنتیکی در نرم افزار Cervus موید آن بود نیز از جمله دلایل مؤثر در رسیدن به درصد بالای ردیابی در تیمارها می‌باشد. از دیگر عوامل مهم در رسیدن به قدرت ردیابی بالا در تحقیق حاضر می‌توان به وجود آلل‌های یگانه در هر سه جایگاه ریزماهواره مورد استفاده در مولدین اشاره نمود. در جایگاه Str ۵۸، ۴۵ درصد از آلل‌های تشخیص داده شده در کل مولدین، آلل‌های یگانه بودند که فقط در یک مولد وجود داشتند. در جایگاه Str۷۳، ۵۰ درصد و در جایگاه Str ۵۹۱ نیز ۵۵ درصد از آلل‌های تشخیص داده شده در کل مولدین، آلل‌های یگانه بودند. بر اساس نتایج آنالیز ردیابی والدین و آلوین‌ها، یکسان‌سازی تعداد اسپرم به ازای هر مولد نر باعث مشارکت متعادل مولدین نر در تولید آلوین‌ها نگردید بطوریکه دو عدد از مولدین نر از مجموع شش مولد موجود، به تنهایی حدود ۶۵ درصد و چهار مولد نر دیگر مجموعاً حدود ۳۵ درصد از آلوین‌ها را تولید نمودند. میزان مشارکت مولدین نر در تولید آلوین‌ها در مورد ترکیب با هر دو مولد ماده به طور معنی‌داری متفاوت بود ($P<0/05$) اما مشارکت مولدین ماده در تولید آلوین‌ها در ترکیب با مولدین نر تفاوت معنی‌داری نداشت($P>0/05$). مشارکت نامتعادل مولدین نر در تولید آلوین‌ها در تیمار اصلی بیانگر وجود رقابت اسپرم در میان مولدین نر مورد استفاده در شرایط تعداد اسپرم مساوی می‌باشد که این مسأله باعث کاهش N_e/N_c به ۰/۶۵ گردید.

بررسی دیگر پارامترهای مربوط به تنوع ژنتیکی از قبیل تعداد آلل‌ها، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و محتوای اطلاعات پلی‌مورفیسم نیز کاهش معنی‌دار تنوع ژنتیکی در آلوین‌ها را نسبت به مولدین نشان دادند ($P<0/05$). کاهش تنوع ژنتیکی در آلوین‌ها نسبت به مولدین در نتیجه کاهش اندازه جمعیت مؤثر در مولدین و انتقال نامناسب ذخیره ژنی مولدین به آلوین‌ها می باشد. در تطابق با نتایج تحقیق حاضر، یکسان سازی غلظت اسپرم در ماهی کپور معمولی نیز منجر به مشارکت متعادل مولدین نر در تولید لاروها در شرایط رقابت اسپرم نشد و به عبارت دیگر پارامتر تعداد اسپرم

Archive of SID
www.SID.ir

توجیه کننده نسبت لاروهای تولید شده توسط مولدین نر نبود (Kaspar*et al*., 2007). درصد لقاح و درصد تفریخ بالا در تیمار شاهد مؤید کیفیت مناسب اسپرم و تخمک استفاده شده در تکثیر مصنوعی مولدین است. بنابراین مولدین نر مورد استفاده کیفیت اسپرم مناسبی برای لقاح دادن تخمک‌ها در شرایط رقابت اسپرم داشته‌اند و تفاوت در میزان مشارکت مولدین نر در تولید آلوین‌ها در تیمارهای مختلف ناشی از عدم توانایی لقاح دادن تخمک‌ها توسط اسپرم نمی‌باشد. نتایج آنالیز ردیابی والدین و فرزندان در تیمار شاهد نشان داد که میزان مشارکت مولدین نر و ماده در تولید آلوین‌ها متعادل می‌باشد. این موضوع همچنین نشان می‌دهد که تفاوتی در میزان زنده مانی آلوین‌های تولید شده توسط هر مولد طی مراحل جذب کیسه زرده، وجود ندارد و مشارکت مولدین در تولید آلوین‌ها تحت تأثیر میزان زنده مانی متفاوت آلوین‌های هر مولد قرار نمی‌گیرد. بررسی دیگر پارامترهای مربوط به تنوع ژنتیکی از قبیل تعداد آلل‌ها در لوکوس‌های ریزماهواره مورد استفاده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و محتوای اطلاعات پلی‌مورفیسم نیز بیانگر عدم کاهش معنی‌دار تنوع ژنتیکی در آلوین‌ها نسبت به مولدین در تیمار شاهد بود ($P>0/05$) در حالیکه در تیمار اصلی کاهش معنی دار تنوع ژنتیکی در آلوین‌ها نسبت به مولدین مشاهده گردید ($P<0/05$).

تحقیقات گذشته در ماهی آزاد دریای خزر نشان داده است که شیوه لقاح مخلوط گامت‌ها که هم اکنون در تکثیر مصنوعی ماهی آزاد استفاده می‌گردد از طریق بروز پدیده رقابت اسپرم در میان مولدین نر، باعث کاهش اندازه جمعیت مؤثر در مولدین و کاهش تنوع ژنتیکی در آلوین‌های تولید شده می‌شود (Sourinejad *et al*., 2011؛ سوری‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۹). تیمارهایی مثل یکسان‌سازی حجم مایع منی (سوری‌نژاد و همکاران، در حال چاپ) و یکسان سازی تعداد اسپرم به ازای هر مولد نر نیز باعث مشارکت متعادل مولدین نر در بارورسازی تخمک‌ها و ترکیب ژنتیکی آلوین‌های ایجاد شده در شیوه لقاح مخلوط نگردید و اختلافات زیادی خصوصاً در میزان مشارکت مولدین نر در تولید آلوین‌ها مشاهده شد که در نتیجه، آلوین‌هایی با کاهش سطح تنوع ژنتیکی نسبت به مولدین، تولید شدند. به نظر می‌رسد موفقیت عمل لقاح و تولید لارو در شرایط رقابت اسپرم در ماهی آزاد دریای خزر به سایر خصوصیات اسپرم مولدین مورد استفاده از جمله تحرک اسپرم و سرعت اسپرم بستگی داشته باشد که بررسی بیشتر این پدیده مدیران مراکز تکثیر را در اتخاذ الگوی لقاح مناسب در تکثیر و کنترل بهتر عوامل کاهش دهنده N_e در مولدین و در نتیجه کاهش دهنده تنوع ژنتیکی در نسل بعد یاری خواهد نمود.

منابع

سوری نژاد، ا.، کلباسی، م.ر.، و مارتینز، پ. ۱۳۸۹. ارزیابی اندازه جمعیت مؤثر مولدین و تأثیر آن بر تنوع ژنتیکی نسل F1 در شیوه فعلی تکثیر مصنوعی ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، ژنتیکنوین، ۵: ۲۱-۳۰.

سوری نژاد، ا.، کلباسی، م.ر.، مارتینز، پ. ۱۳۹۱. تأثیر یکسان سازی حجم مایع منی در شیوه لقاح مخلوط ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* بر میزان مشارکت ژنتیکی مولدین در تولید آلوین ها، نشریه شیلات، ۶۵: ۳۹-۵۲.

Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., Linhart, O. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp.Aquacult. 129: 95-112.

Brown, R.C., Woolliams, J.A., McAndrew, B.J. 2005. Factors influencing effective population size in commercial populations of gilthead seabream, *Sparusaurata*. Aquaculture. 247: 219-225.

Castro, J., Pino, A., Hermida, M., Bouza, C., Chavarrías, D., Merino, P., Sánchez, L., Martínez, P. 2007. A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead seabream (*Sparusaurata*). Aquaculture 272: 210-216.

Archive of SID

www.SID.ir

losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. Aquaculture. 264: 59-65.

Martinez, P., Fernandez, J. 2009. Estimating parentage relationships using molecular markers in aquaculture. In: Aquaculture Research Trends. New York: Nova Science Publishers, pp59-112.

Porta, J., Porta, J.M., Martinez-Rodriguez, G., Alvarez, M.D.C. 2006. Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Soleasenegalensis*) and its application to broodstock management. Aquaculture. 256: 159-166.

Presa, P., Guyomard, R. 1996. Conservation of microsatellites in three species of salmonids. Fish Biol. 49: 1326-1329.

Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory press, New York.

Sourinejad, I., Kalbassi, M.R., Pino-Querido, A., Vera, M., Bouza, C., Martinez, P. 2011. Parentage assignment of progeny in mixed milt fertilization of Caspian brown trout *Salmo trutta caspius* using microsatellite DNA markers: Implications for conservation. Afr. J. Biotechnol. 10(26): 5084-5090.

Taggart, J.B. 2007. FAP: an exclusion-based parental assignment program with enhanced predictive functions. Molecular Ecology Notes. 7: 412-415.

Tvedt, H. B., Benfey, T. J., Martin-Robichaud, D. J., Power, J. 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization 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., Linhart, O. 2004. Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquaculture. 235: 223-236.

Wedekind, C., Rudolfsen, G., Jacob, A., Urbach, D., Muller, R. 2007. The genetic consequences of Hatchery-induced sperm competition in a salmonid. Biol. Conserv. 137: 180-188.

Estoup, A., Largiader, C.R., Perrot, E., Chourrout, D. 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic marker and transgenes. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 5: 295-298.

Frost, L.A., Evans, B.S., Jerry, D.R. 2006. Loss of genetic diversity to hatchery culture practices in barramundi (*Latescalcarifer*). Aquacult. 261: 1056-1064.

Hara, M., Sekino, M. 2003. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthysolivaceus* using microsatellite DNA marker. Aquaculture. 217: 107-114.

Horreo, J.L., Machado-Schiaffino, G., Griffiths, A., Bright, D., Stevens, J., Garcia-Vazquez, E. 2008. Identification of differential broodstock contribution affecting genetic variability in hatchery stocks of Atlantic salmon (*Salmosalar*). Aquaculture. 280: 89-93.

Jackson, T.R., Martin-Robichaud, D.J., Reith, M.E. 2003.Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut (*Hippoglossushippoglossus*) broodstock. Aquaculture. 220: 245-259.

Jalali, M.A., Mojazi Amiri, B. 2009. Threatened fishes of the world: *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877) (Salmoniforms: Salmonidae). Environ. Biol. Fish 86: 375-376.

Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Mol. Ecol. 16: 1099-1106.

Kaspar, V., Kohlmann, K., Vandeputte, M., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Alavi, S.M.H., Hulak, M., Linhart, O. 2007. Equalizing sperm concentrations in a common carp (*Cyprinus carpio*) sperm pool does not affect variance in proportions of larvae sired in competition. Aquaculture. 272: 204-209.

Kim, S. G., Morishima, K., Satoh, N., Fujioka, T., Saito, A., Arai, K. 2007. Parentage assignment in hatchery population of brown sole *Pleuronectesherzensteini* by microsatellite DNA markers. Fish Sci. 73: 1087-1093.

Linhart, O., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Rodriguez, M. 2003. Improvement of common carp artificial reproduction using enzyme for elimination of eggs stickiness. Aquatic Living Resources. 16: 450-456.

Machado-Schiaffino, G., Dopico, E., Garcia-Vazquez, E. 2007. Genetic variation

Archive of SID

www.SID.ir