تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال پنجم، شماره چهاردهم، بهار ۱۳۹۲، صفحه ۱۷-۳۴
دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۳/۲۱ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۰۶/۲۸

بررسی تأثیر رقابت اسپرم بر تنوع ژنتیکی نتاج قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

حسین مرادیان [۱]، سعید کیوان شکوه [۱]*، مصطفی محقق دولت‌آبادی [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 ریزماهواره (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 ریزماهواره‌ها 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 (n=۳۰، r=۰/۹۱۵، P=۰/۰۱). 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 (۹۵٪<) بود و موفقیت لقاح به استفاده از اسپرم یک یا چند ماهی نر بستگی نداشت (P>۰/۰۵).

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

مقدمه

با افزایش تقاضای بچه ماهی قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*) به همراه گسترش مراکز تکثیر و تولید در کشور طی سال‌های اخیر، تکثیر

* keyvan56@kmsu.ac.ir

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 تخم قلمداد 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 آبزی‌پروری 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 تفریخگاه‌ها، 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 می‌کند رقابت اسپرم ایجاد شده در مراکز تکثیر به دلیل اختلاف موجود در شاخص‌های کمّی 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 صفت‌های 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 جنبش 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 کارآیی تولید آبزی‌پروری وجود دارد. طراحی یک برنامه اصلاح نژاد و کاهش اثرات هم‌خونی نیازمند مشخص نمودن والدین است.

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 ریزماهواره‌ها در تعیین والدین ماهیان پرورشی صورت گرفته است (Herbinger *et al.*, 1995؛ Perez-Jackson *et al.*, 2003؛ Enrique and Tanigushi, 1999؛ Castro *et al.*, 2004؛ McDonald *et al.*, 2004؛ Sekino *et al.*, 2004).

از جمله نشانگرهای مولکولی، ریزماهواره‌ها هستند که با داشتن مزایایی چون چندشکلی بالا، طبیعت چند اللی، توارث همبارز، 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، ریزماهواره‌ها در زمینه شیلات و آبزی‌پروری 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 (Wilson and Ferguson, 2002؛ Castro *et al.*, 2004؛ Chistiakov *et al.*, 2006). 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.

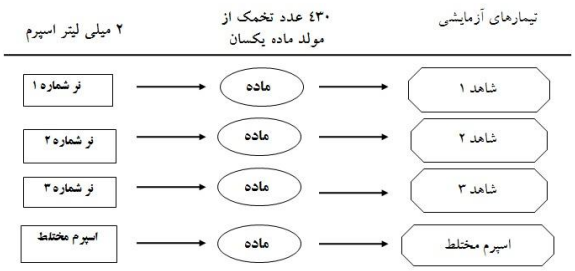
جمع‌آوری اسپرم و تخمک: اسپرم‌گیری از مولدین در اواخر اسفند ماه سال ۱۳۸۷ در طول فصل تکثیر طبیعی صورت گرفت. مولدین نر پس از معاینه و بیهوشی توسط پودر گل میخک (۱۵۰ ppm) (مهرابی، ۱۳۸۱) ابتدا زیست‌سنجی شده، سپس با ماساژ شکمی به طور جداگانه اقدام به اسپرم‌کشی از آنها گردید. برای ممانعت از بروز هر گونه آلودگی 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

هماسیتومتر تخمین زده شد. به منظور رسیدن اسپرم‌ها به تراکم قابل شمارش، نمونه‌ها در سرم فیزیولوژیک ۰/۶ تا ۰/۷ 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 میلی‌لیتر 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.

بررسی و ارزیابی کیفیت اسپرم: مدت زمان تحرک اسپرم زمانی است که پس از فعال‌سازی، ۹۵ درصد اسپرم‌ها حرکت رو به جلو داشته باشند. به منظور ارزیابی تحرک اسپرم، پس از اسپرم‌گیری حدود ۱۰ میکرولیتر از اسپرم بر روی لام قرار داده، سپس، توسط یک فعال‌کننده (آب) فعال شد و مدت زمان تحرک تا زمانی که تمام اسپرم‌ها غیرفعال شوند توسط کورنومتر ثبت گردید. مدت زمان‌هایی که ۹۵ درصد اسپرم‌ها تحرک 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 میلی‌لیتر 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 آزمایش در نظر گرفته شد.

برای انجام لقاح از حجم یکسان اسپرم (۲ میلی‌لیتر) 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 ۱: ۱×۱۰^{۷} 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 میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر و در مجموع ۶ میلی‌لیتر)، با همان حجم دو میلی‌لیتر اسپرم اضافه گردید (شکل ۱). به منظور اطمینان از قابلیت بارورسازی، موفقیت در میزان تفریخ 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 میلی‌لیتر) استفاده شد.



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

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 به 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 ۰/۵±۱۰/۸ 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؛ Geffen and Evans, 2000؛ Ottesen *et al.*, 2009).

$$\text{درصد لقاح} = \frac{\text{تعداد تخم‌های لقاح یافته}}{\text{تعداد کل تخمک‌ها}} \times ۱۰۰$$

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

$$\text{درصد چشم‌زدگی تخم‌های لقاح یافته} = \frac{\text{تعداد تخم‌های چشم‌زده}}{\text{تعداد تخم‌های لقاح یافته}} \times ۱۰۰$$

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):

$$\text{درصد تفریخ لاروها} = \frac{\text{تعداد لاروهای تفریخ شده}}{\text{تعداد تخم‌های چشم‌زده}} \times ۱۰۰$$

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 ریزماهواره 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.

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، 1X بافر PCR، ۲۰۰ میکرومولار از هر dNTP، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۷ واحد آنزیم تگ‌پلیمراز و ۱/۷۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم استفاده شد. برنامه حرارتی PCR نیز به صورت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه جهت واسرشت‌سازی اولیه تنظیم شد و 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 پلی‌اکریل‌آمید ۶ درصد صورت گرفت و از رنگ‌آمیزی نیترات نقره برای ظاهرسازی باندها روی ژل پلی‌اکریل‌آمید استفاده شد (Pourkazemi, 1996).

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

نام جایگاه ژنی	واحد تکرار شونده	توال آغازگرهای رفت (foreward) و برگشت (reverse)	دمای اتصال (°C)
OMM1036	TATC	F-TGTAGCAGGTGAGAATACCCA R-CACCATCTCCATCCTAGGC	۶۰
Ssa85	GT	F-AGGTGGGTCCTCCAAGCTAC R-ACCCGCTCCTCACTTAATC	۵۵
Ocl8	GT	F-TAGTGTTCCGTGTTCGCCTG R-CACCTTCCATCTCTCATTCCAC	۵۷
OMM1307	CTAT	F-GCACAACTACGAAACCCAA R-TGCCAGCTCTGCTATGACATT	۵۲
OMM1315	CATC	F-TACAGGGCTTGGCTCTATCTC R-GCCAAATACTTTCGCAAGG	۶۱
Ssa197	GTGA	F-GGGTTGAGTAGGGAGGCTTG R-TGGCAGGGATTTGACATAAC	۶۰

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_o) 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. از آزمون توکی برای بررسی معنی‌دار بودن اختلاف میانگین‌ها و سطح معنی‌داری استفاده شد. سنجش تأثیر شاخص‌های اسپرم‌شناختی بر روی میزان لقاح، درصد چشم‌زدگی، تفریخ و بازماندگی لارو از آنالیز واریانس یک‌طرفه 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

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 معنی‌داری بیشتر از سایر مولدین نر بود (P<۰/۰۵)، در حالی‌که اختلاف معنی‌داری در مدت زمان تحرک سایر تیمارها مشاهده نشد (P≥۰/۰۵). بیشترین تراکم اسپرم (۱۰۹ × ۱/۱۱± ۱۵/۹۱) 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 معنی‌دار بود (P<۰/۰۵)، ولی با تیمار مخلوط اسپرم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P≥۰/۰۵).

درصد لقاح، چشم‌زدگی و میزان تفریخ: جنین‌ها در روز نهم به مرحله اندام‌زایی و در هجدهمین روز به مرحله چشم‌زدگی رسیدند و تخم‌گشایی 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 باندی ایجاد ننمودند.

جدول ۲- میانگین ویژگی های زیست‌سنجی و کیفی اسپرم مولدین نر. وجود حداقل یک حرف مشترک در هر ردیف بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است و حروف غیر مشترک بیانگر اختلاف معنی دار (P<۰/۰۵) است.

تیمار	وزن بدن (گرم)	طول کل (سانتی‌متر)	حجم اسپرم (میلی‌لیتر)	مدت زمان تحرک (ثانیه)	تراکم اسپرم $۱۰^{۹}$ Cell/ml
نر شماره ۱	۱۵۸۰	۴۵	۱۲	۴۳/۴۶ ± ۰/۹۹[a]	[a]۱۳/۲۰ ±۱/۱۲
نر شماره ۲	۱۸۴۰	۴۷	۱۳	۵۳/۶۰ ± ۴/۹۳[b]	[a]۱۱/۹۱ ±۰/۵۵
نر شماره ۳	۱۷۱۰	۴۵	۱۲	۴۳/۹۰ ± ۲/۰۴[a]	[b]۱۵/۹۱ ±۱/۱۱
اسپرم مختلط	-	-		۳۹/۴۳ ± ۲/۴۲[a]	[ab]۱۳/۸۰ ±۰/۳۶

جدول ۳- درصد لقاح، چشم‌زدگی و تفریخ در تیمارهای تک والدی و مختلط. وجود حداقل یک حرف مشترک در هر ردیف بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار و حروف غیر مشترک بیانگر اختلاف معنی دار (P<۰/۰۵) است.

تیمار	لقاح (درصد ± انحراف معیار)	چشم‌زدگی (درصد ± انحراف معیار)	تفریخ (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]

جدول ۴- نتایج PCR حاصل از آغازگرهای استفاده شده در آنالیز ریزماهواره قزل‌آلای رنگین‌کمان

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 OMM103 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 رنگین‌کمان

جایگاه آلل	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 Ocl8 و سه آلل برای جایگاه تک‌شکل متغیر بود. جایگاه‌های ژنی چندشکل OMM1036 و Ocl8 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 رنگین‌کمان .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 اطلاعات 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
OCl8	۴	۰/۹۱۴	۰/۸۵۸	۰/۷۳۲	۰/۵۳۶	۰/۶۴۸	-۰/۰۶۵

برای مقایسه شاخص‌های تنوع ژنتیکی مولدین نر و لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمان، 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 Ocl8 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 Ocl8 در لاروها کمتر 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<۰/۰۵). در تیمار سوم تعداد آلل‌ها بین مولدین نر و لاروها در در هر دو جایگاه ژنی چندشکل OMM1036 و OCl8 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<۰/۰۵). در تیمار چهارم تعداد آلل‌ها بین مولدین و لاروها در هر دو جایگاه ژنی چندشکل OMM1036 و OCl8 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 معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).

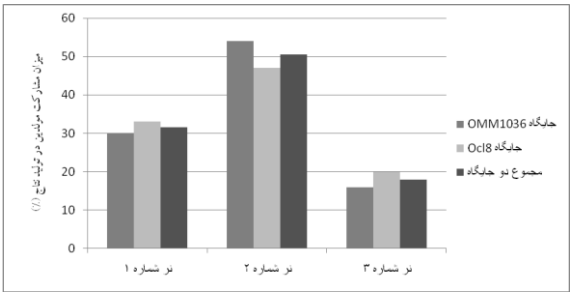
جدول ۷- مقایسه شاخص‌های تنوع ژنتیکی در دو جایگاه مختلف چندشکل در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

شاخص	جایگاه ژنی / تیمار	OMM1036		OCl8		میانگین	
		مولدین نر	لاروها	مولدین نر	لاروها	مولدین نر	لاروها
N.A. (تعداد آلل‌ها)	تیمار اول	۶	۶	۴	۴	۵	۵
	تیمار دوم	۵	۵	۴	۳	۵	۱۰
	تیمار سوم	۵	۴	۳	۳	۴	۳/۵
	تیمار چهارم	۶	۶	۴	۴	۵	۵
He (هتروزیگوسیتی مشاهده شده)	تیمار اول	۰/۸۸۷	۰/۷۸۷	۰/۸۴۸	۰/۷۲۲	۰/۸۶۷	۰/۷۵۴± ۰/۰۱۱
	تیمار دوم	۰/۹۱۲	۰/۸۲۳	۰/۸۵۶	۰/۶۸۹	۰/۸۹۱	۰/۷۵۶± ۰/۰۰۷
	تیمار سوم	۰/۹۴۵	۰/۸۳۵	۰/۸۶۸	۰/۷۳۶	۰/۹۲۶	۰/۷۷۳± ۰/۰۰۹
	تیمار چهارم	۰/۹۳۶	۰/۸۵۲	۰/۷۹۹	۰/۷۲۲	۰/۸۶۲	۰/۷۸۱± ۰/۰۰۷
Ho (هتروزیگوسیتی مورد انتظار)	تیمار اول	۰/۹۸۳	۰/۸۵۴	۰/۸۶۸	۰/۶۸۸	۰/۹۲۷	۰/۷۸۱± ۰/۰۰۵
	تیمار دوم	۰/۹۷۸	۰/۹۲۱	۰/۸۶۷	۰/۷۰۳	۰/۹۳۳	۰/۸۱۲± ۰/۰۰۲
	تیمار سوم	۱	۰/۹۳۴	۰/۹۱۹	۰/۷۵۹	۰/۹۵۷	۰/۸۶۰± ۰/۰۱۹
	تیمار چهارم	۰/۹۹۲	۰/۸۹۹	۰/۸۴۵	۰/۶۸۲	۰/۹۱۸	۰/۷۹۰± ۰/۰۱۰
PIC (محتوای اطلاعات چندشکلی)	تیمار اول	۰/۸۴۸	۰/۷۶۹	۰/۷۲۴	۰/۶۵۵	۰/۷۸۰	۰/۷۱۲± ۰/۰۰۹
	تیمار دوم	۰/۸۳۳	۰/۷۹۹	۰/۷۸۴	۰/۶۵۶	۰/۸۲۴	۰/۷۲۸± ۰/۰۰۷
	تیمار سوم	۰/۸۳۷	۰/۸۰۱	۰/۷۴۵	۰/۶۰۹	۰/۷۹۶	۰/۷۰۵± ۰/۰۰۸
	تیمار چهارم	۰/۸۴۹	۰/۸۰۹	۰/۷۷۴	۰/۷۴۵	۰/۷۹۹	۰/۷۶۷± ۰/۰۱۱

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

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 در تولید نتاج بود (n=۳۰، r=۰/۸۵۷، P<۰/۰۱). همبستگی بین تراکم اسپرم با میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج نیز منفی و معنی‌دار بود (n=۳۰، r=-۰/۹۱۵، P<۰/۰۱).

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 بر هم خوردن تعادل یونی مایع سمینال باشد.

تراکم اسپرم نیز از ۰/۵۵± ۱۱/۹۱ میلیارد در میلی‌لیتر اسپرم در نر شماره ۲ تا ۱/۱۱± ۱۵/۹۱ میلیارد در نر شماره ۳ متغیر بوده است. اختلاف در برآورد تراکم اسپرم در مطالعات مختلف می‌تواند به دلایل متفاوتی از جمله نوع پیپت 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

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 قزل‌آلای رنگین‌کمان با میزان مشارکت مولدین نر در تولید نتاج، نشان‌دهنده همبستگی مثبت میان مدت زمان تحرک اسپرم با میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج بود (n=۳۰، r=۰/۸۵۷، P<۰/۰۱). 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 معنی‌دار 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 قزل‌آلای رنگین‌کمان 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 معنی‌داری بین تحرک اسپرم و موفقیت تولید مثلی مولدین نر مشاهده گردید (Tvedt *et al.*, 2001). سوری‌نژاد (۱۳۸۹) نیز در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) رابطه مثبت و معنی‌داری 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 (Casselman *et al.*, 2006) با میزان تحرک اسپرم همبستگی معنی‌داری نداشته است.

در تحقیق حاضر، استفاده از نشانگرهای ریزماهواره با میزان مناسبی از قدرت ردیابی والدین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان همراه بود. والدین لاروهایی که به شیوه لقاح اسپرم مختلط تولید شده بودند، با به‌کارگیری تکنیک ردیابی والدین در نرم‌افزار 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 تشکیل‌دهنده ردیابی شدند. در میان گزارش‌های منتشر شده در زمینه استفاده از جایگاه‌های ژنی ریزماهواره برای

ردیـــابی والـــدین و فرزنـــدان، 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 ریزماهواره تعیین نمودند.

Hara و Sekino (۲۰۰۳) میـــزان ۸۶ درصـــد 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 ریزماهواره 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 ریزماهواره 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 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 (*Pleuronectes herzensteini*) را به والدین تشکیل‌دهنده با استفاده از پنج جایگاه ژنی ریزماهواره انجام دادند. استفاده از نشانگرهای ریزماهواره دارای بیشترین تنوع ژنتیکی و بیشترین قدرت ردیابی والدین در قزل‌آلای رنگین‌کمان، بر اساس آنالیز اولیه نشانگرهای ریزماهواره 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 ریزماهواره استفاده شده در مولدین و لاروها نیز از جمله دلایل 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 منحصربه 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 ریزماهواره 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 ($P<۰/۰۵$) 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 ($n=۳۰$، $r=-۰/۹۱۵$، $P<۰/۰۱$)، 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

جاری تخم‌ریزی می‌کند در حالی که ماهی آبشش آبی در آب‌های ساکن دریاچه‌ها تخم‌ریزی می‌کند. بنابراین، شاید در آب‌های جاری اسپرم‌های سریع‌تر و در آب‌های ساکن تعداد اسپرم‌ها 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 تخم‌ریزی و لقاح، رفتارهای تخم‌ریزی و ویژگی‌های گامت‌ها برای نفوذ به میکروپیل اشاره کرده‌اند. لذا، نتایج به دست آمده از میزان مشارکت مولدین در تولید نتاج، نشان‌دهنده این مطلب است که نر شماره ۳ در مقایسه با دیگر ماهیان مولد نر از قابلیت رقابت و بارورکنندگی کمتری برخوردار بوده است. از آنجا که ممکن است شاخص‌های دیگر اسپرم‌شناختی از جمله سرعت شنای اسپرم، مدت زمان تحرک و درصد اسپرم‌های متحرک الزاماً بالا نباشد و نقش این شاخص‌ها چشمگیرتر باشد (Gage *et al*., 2004)، این نتیجه می‌تواند بدین معنی باشد که تعداد اسپرم ممکن است دارای ارتباط معنی‌داری با موفقیت لقاح باشند ولی نمی‌توانند به عنوان شاخصی مناسب برای پیش‌بینی قدرت بارورسازی اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان مطرح باشند. در مطالعه Ottesen و همکاران (۲۰۰۹)، در آزمایش رقابت اسپرم در ماهی هالیبوت اقیانوس اطلس نیز نتایج مشابهی به دست آمد، به طوری‌که 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 انگشت‌نگاری DNA ریزماهواره‌ها در ماهی آزاد اقیانوس اطلس نشان دادند که سرعت نسبی اسپرم، عامل اصلی تعیین‌کننده برتری اسپرم در عملیات لقاح است و هیچ گونه رابطه معنی‌داری 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 می‌یابد ولی در این مطالعه، میزان مشارکت والدین در ایجاد نتاج، بررسی نشده بود. در تحقیق حاضر، تراکم اسپرم تعیین‌کننده 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 مشخص‌کننده موفقیت مولدین نر در ایجاد نتاج نبوده است. در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز تراکم اسپرم رابطه منفی با میزان مشارکت مولدین نر در لقاح تخمک‌ها داشته است (Tuest *et al*., 2008). تعداد اسپرم زمانی در موفقیت بارورسازی مهم است که رقابت اسپرم از یک فرآیند بخت‌آزمایی پیروی کند. در بخت‌آزمایی، قدرت بارورسازی هر ماهی نر در ارتباط با تعداد اسپرم‌هایی است که در رقابت شرکت دارند (Parker, 1990). برای مثال، در ماهی آبشش آبی (*Lepomis macrochirus*)، آزمون‌های لقاح در شرایط آزمایشگاهی که در آن رقابت میان جفت نرها مورد بررسی قرار داده شدند، نشان داد که با

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 سهیم هستند (Hallerman, 2003). تحقیقاتی که اخیراً به بررسی شیوه تکثیر مصنوعی مولدین پرداخته است نیز بر این 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 (Campton, 2004؛ Ribolli and Zaniboni-Filho, 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 تک والدی و مختلط، هنگامی که میزان مناسب اسپرم به ازای تخمک (10^7) استفاده شد، درصد موفقیت لقاح بالا (۹۵٪<) 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.

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 Montgommerie, 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 hippoglos*sus) 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.

Effects of sperm competition on genetic variation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) progeny using microsattelite markers

Hossein Moradyan [1], Saeed Keyvanshokooh [1]*, Mustafa Muhaghegh Dolatabady [2] and Einollah Gorjipour [3]

[1] Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran
[2] Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Yasouj, Iran
[3] Shahid Motahhari Genetics and Breeding Research Center for Cold-Water Fishes, Yasouj, Iran

Abstract

In this research, the variation of spermatozoa traits among three male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) was used to examine how the relative influences of sperm density and duration of sperm motility account for sperm competition success. Sperm competition trial was conducted to study the fertilization ability of sperms from three male rainbow trout. The proportions of larvae sired by different males were quantified using DNA microsatellite analysis. Larvae sired by male number 2 dominated the offsprings; this male sired 56% and 48% of the offspring checked in the paternity test using OMM1036 and Ocl8 loci respectively. Microsatellite DNA fingerprinting revealed that duration of sperm motility was conducive to sperm competition success. There was no significant relationship between fertilization success and either relative sperm count or duration of sperm motility; sperm count showed an inverse relationship with competition success ($P<0.01$, $r=-0.915$, $n=30$). Therefore, the results showed that under the experimental conditions for rainbow trout gametes, duration of sperm motility was a key spermatozoa character affecting sperm competition success. In the both control (paired mating treatments) and mixed milt fertilization groups, fertilization rates were high (>95%) when sufficient numbers (10^7) of spermatozoa per egg were used. Therefore, the fertilization success did not depend on whether sperm from one, or from a mixture of more males were used.

Key words: Genetic variation, Sperm competition, Microsattelites, Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Fertilization

* keyvan56@kmsu.ac.ir