تاثير يکسان سازي حجم مايع مني در لقاح مخلوط ماهي آزاد درياي خزر بر مشارکت ژنتيکي مولدان در نسل F_1

ايمان سوري نژاد[۱]، محمد رضا کلباسي*[۲] و پائولينو مارتينز[۳]
[۱] گروه شيلات، دانشکده علوم دريايي دانشگاه تربيت مدرس، ايران
[۲] گروه شيلات، دانشکده علوم دريايي دانشگاه تربيت مدرس، ايران
۳گروه ژنتيک، دانشکده دامپزشکي دانشگاه سانتياگو د کامپوستلا، اسپانيا
(تاريخ دريافت: ۱۳۸۹/۴/۱۳ ، تاريخ تصويب: ۱۳۹۰/۱۰/۲۰)

چکيده
با توجه به اهميت مشارکت ژنتيکي تمامي مولدين مورداستفاده درتکثير مصنوعي ماهي آزاد درياي خزر براي افزايش خزانه ژني نسلهاي بعد، تاثير يکسان‌سازي حجم مايع مني مولدين مختلف در توليد نسل F_1 به شيوه لقاح مخلوط، با محاسبه اندازه جمعيت موثر (N_e) در لقاح مخلوط چهار مولد نر و ماده با حجم و تعداد مساوي مايع مني و تخمک در دو تيمار مورد بررسي قرار گرفت. ارزيابي مشارکت ژنتيکي به کمک واکنش زنجيره اي پليمراز و با استفاده از سه جايگاه ريز ماهواره داراي آللهاي يگانه (Str591,73, 58) انجام شد. ژنوتيپ والدين و نسل F_1 با دستگاه توالي ياب خودکار تعيين و آللها با نرم افزار GeneMapper امتيازدهي شدند. والدين بر اساس روش حذف و با استفاده از ۳ جايگاه با بيشترين قدرت رديابي از طريق نرم افزار FAP رديابي گرديدند. ميزان N_e در تيمارهاي اول و دوم به ترتيب ۰/۸۴ و ۰/۵۱ محاسبه گرديد که مبين کاهش معني‌دار تنوع ژنتيکي در آلوين‌ها بود ($P<0/05$). يکسان نمودن حجم مايع مني و تعداد تخمک نه تنها منجر به مشارکت متعادل مولدان در توليد نسل بعدي نگرديد، بلکه اختلافات زيادي در ميزان مشارکت ژنتيکي مولدان و بويژه جنس نر در توليد آلوين‌ها ايجاد نمود. افزايش N_e در تکثير مصنوعي مولدان ماهي آزاد درياي خزر مستلزم انجام اصلاحاتي در الگوي آميزش مولدان اين ماهي در مراکز تکثير ايران مي‌باشد.

واژه هاي کليدي: اندازه جمعيت مؤثر، حجم مايع مني، ريزماهواره، *Salmo trutta caspius*

* نويسنده مسئول: تلفن: ۰۹۱۱۲۲۰۴۳۳۶ فاکس:01226253499 E-mail: Kalbassi_m@modares.ac.ir

مقدمه

در تكثير مصنوعي آزاد ماهيان و ساير گونه‌هايي كه براي بازسازي ذخاير طبيعي استفاده مي‌شوند، تنوع ژنتيكي بچه ماهيان توليد شده در مراكز تكثير عموماً در مقايسه با مولدان كاهش مي‌يابد (Horreo *et al.*, 2008).كاهش ميزان تنوع ژنتيكي منجر به اثرات بالقوه مضر روي ويژگي‌هاي عملكردي مختلف از جمله بازماندگي و رشد در ماهيان مي گردد و استفاده از اين ماهيان براي بازسازي ذخاير، كاهش تنوع ژنتيكي در جوامع طبيعي، افزايش ميزان آميزش خويشاوندي و در نهايت انقراض نسل آنها را به دنبال خواهد داشت (Machado-Schiaffino *et al.*, 2007). ميزان انتقال تنوع ژنتيكي در يک جمعيت از يک نسل به نسل بعدي بر اساس اندازه جمعيت مؤثر (Effective Population Size) تعريف مي‌شود (Primack, 1998). اندازه جمعيت مؤثر N_e، تعداد واقعي مولداني است كه در يک برنامه تكثير از ميان تعداد كل مولدان مورد استفاده (Total number of breeders)، در تشكيل لاروها مشاركت مي كنند. در مراكز تكثير اندازه جمعيت مؤثر عمدتاً به دليل اتخاذ شيوه لقاح مخلوط در تكثير (Mixed milt fertilization) كمتر از تعداد كل مولدان استفاده شده در تكثير N_b است (Brown *et al*., 2005).در اين صورت همه مولدان تكثير شده به خصوص مولدان نر، در توليد بچه ماهيان و انتقال صفات خود به نسل بعد به يک ميزان مشاركت ژنتيكي نمي نمايند و در نتيجه ميزان تنوع ژنتيكي در نسل F_1 كاهش خواهد يافت (Frost *et al.*, 2006; Machado-Schiaffino *et al.*, 2007).

به نظر مي رسد مشاركت مولدان نر در توليد لارو در شيوه لقاح مخلوط گامتها، به خصوصيات اسپرم مولدان مورد استفاده از جمله حجم مايع مني (Milt volume) بستگي داشته باشد ولي ارتباط اين عامل با ميزان موفقيت توليد مثلي مولدان نر هنوز به طور كامل مشخص نشده است و تناقض هاي زيادي در اين زمينه به چشم مي خورد (Kaspar و همكاران، ۲۰۰۷؛ Wedekind و همكاران، ۲۰۰۷). تا زمان ظهور تكنيک هاي مولكولي ردیابي والدين با استفاده از DNA، تعيين ميزان مشاركت مولدان در توليد فرزندان در لقاح مخلوط گامتها دشوار بود. در گذشته جهت تشخيص والدين لاروها، لازم بود تا گروه‌هاي لاروي به طور جداگانه و تا زماني كه بتوان آنها را با استفاده از علائم فيزيكي نشانه گذاري نمود پرورش مي يافتند كه اين كار هزينه بر و زمان بر بوده و تنها در شرايط آزمايشگاهي قابل انجام بود.

اما امروزه با ظهور نشانگرهاي ژنتيكي خصوصا ريزماهواره‌ها (Microsatellite)، رديابي مولكولي والدين و تعيين ميزان مشاركت آنها در توليد فرزندان در لقاح مخلوط تسهيل گرديده است (Jackson *et al.*, 2003). نشانگرهاي ريزماهواره كه توالي هاي كوتاه (۱-۶ جفت باز) تكرار شونده در ژنوم موجودات مي باشند، يک نوع علائم طبيعي زيست شناختي بوده كه پس از لقاح، از والدين به فرزندان منتقل مي شوند و به دليل توارث همبارز (Codominant)، تنوع بالا و فراواني در ژنوم، ابزار قدرتمندي براي مطالعات رديابي والدين مي باشند (Castro *et al.*, 2007). اين نشانگرها به طور موفقيت آميزي جهت بررسي ميزان مشاركت واقعي مولدان و تعيين اندازه جمعيت مؤثر در چند گونه ماهي پرورشي از جمله باس آسيايي Lates calarifer (Frost *et al.*, 2006)، كفشک سنگالي Solea senegalensis (Porta *et al.*, 2006) و آزاد ماهي اقيانوس اطلس Salmo salar (Horreo *et al.*, 2008) استفاده شده اند. در يكي از جديدترين تحقيقات صورت پذيرفته در آزادماهيان، مطالعه مشاركت مولدان نر و ماده ماهي آزاد اقيانوس اطلس در توليد آلوين‌ها در شيوه لقاح مخلوط و تأثير آن بر ميزان تنوع ژنتيكي با استفاده از شش جايگاه ريزماهواره، بيانگر مشاركت نامتعادل مولدان نر و ماده در آلوين‌هاي توليد شده بود كه در نهايت باعث كاهش ميزان تنوع ژنتيكي گرديد (Horreo *et al.*, 2008).

ماهي آزاد درياي خزر *Salmo trutta caspius*، يكي از ۹ زير گونه ماهي قزل آلاي قهوه اي *Salmo trutta* و بومي درياي خزر مي باشد كه ذخاير پر ارزش آن طي دهه هاي اخير به دليل افزايش فشار صيادي، نابودي مكان هاي تخم ريزي و تخريب زيستگاه‌ها به شدت كاهش يافته

است. عوامل مذكور منجر به كاهش شديد تكثير طبيعي اين گونه با ارزش و قرار گيري آن در ليست قرمز IUCN شده است (Jalali and Mojazi Amiri, 2009)؛ لذا شيلات ايران به منظور حفظ و بازسازي ذخاير ماهي آزاد، اقدام به تكثير مصنوعي مولدان و رهاسازي بچه ماهيان توليد شده به رودخانه هاي منتهي به درياي خزر نموده است. طبق روند مرسوم، جهت تكثير مولدان ماهي آزاد از شيوه لقاح مخلوط به صورت تركيب مايع مني ۳-۴ مولد نر با مخلوط تخمک همين تعداد مولد ماده استفاده مي شود. نتايج بررسيهاي اخير حاكي از آن است كه اتخاذ شيوه لقاح مخلوط در شيوه فعلي تكثير مصنوعي ماهي آزاد درياي خزر مشاركت متفاوت مولدان نر و ماده در توليد آلوين‌ها، كاهش اندازه جمعيت مؤثر در مولدان و در نتيجه كاهش تنوع ژنتيكي در نسل بعد را به دنبال داشته است (Sourinejad *et al.*, 2010). در تنها تحقيق صورت گرفته در زمينه رديابي مولكولي والدين و فرزندان در ماهي آزاد درياي خزر با استفاده از نشانگرهاي ريز ماهواره، نتايج رديابي نشان داد كه مشاركت مولدان در توليد آلوين‌ها در شيوه لقاح مخلوط گامت‌ها بسيار نامتعادل بوده و در اين خصوص اختلافات زيادي خصوصاً در ميزان مشاركت مولدان نر در توليد آلوين‌ها مشاهده گرديد. بنحوي كه تنها يكي از چهار مولد نر حدود ۷۰ درصد و سه مولد ديگر مجموعا ۳۰ درصد (۸۶/ ۴ تا ۱۸/۸۳%) آلوين‌ها را توليد نمودند و بررسي بيشتر در خصوص تأثير يكسان سازي حجم مايع مني مولدان نر بر ميزان مشاركت آنها در توليد آلوين ها به عنوان موضوع مهمي براي تحقيقات آينده در اين زمينه ذكر گرديد (Sourinejad *et al.*, 2010).

با توجه به اينكه تاكنون تحقيقي در زمينه بررسي ارتباط خصوصيات اسپرم مولدان ماهي آزاد درياي خزر از جمله حجم مايع مني با ميزان مشاركت آنها در توليد آلوين ها در شيوه فعلي تكثير مصنوعي اين گونه گزارش نگرديده است، لذا اين تحقيق با اهداف بررسي تأثير يكسان سازي حجم مايع مني مولدان نر بر ميزان مشاركت آنها در توليد آلوين ها در لقاح مخلوط گامتها در ماهي آزاد درياي خزر با استفاده از نشانگرهاي ريز ماهواره و همچنين مقايسه تنوع ژنتيكي مولدان و آلوين هاي توليد شده از آنها در لقاح مخلوط گامتها با حجم يكسان مايع مني به ازاي هر مولد نر در نظر گرفته شد.

مواد و روش کار

تكثير مولدان، توليد آلوين ها و نمونه برداري

تكثير مولدان در كارگاه تكثير آزاد ماهيان كلاردشت و به روش لقاح خشک صورت پذيرفت. تخمک و اسپرم مورد نياز از چهار مولد ماده (۵۵/۷۵±۴/۵۲ cm و ۱۸۲۵±۴۹۵/۶۰gr) و شش مولد نر (۵۴/۱۷±۲/۷۶cm و ۱۹۸۳/۳۳±۲۱۲gr) ماهي آزاد كه در فصل تكثير از رودخانه چشمه كيله تنكابن صيد شده بودند، استحصال گرديد. در شيوه فعلي لقاح مخلوط در كارگاه تكثير از نسبت متغير مولدان نر (۳ تا ۴ مولد نر) به ماده (معمولاً ۴ مولد ماده) استفاده مي شود، لذا در اين بررسي نيز تكثير مولدان در دو تيمار مختلف (در دو تكرار همزمان) با استفاده از ۴ مولد نر و ۴ مولد ماده در هر تيمار و با حجم مساوي مايع مني و همچنين تعداد مساوي تخمک انجام پذيرفت. در ابتدا تخمک چهار مولد ماده (شماره۱، ۲، ۳ و ۴) به طور كامل استحصال شد. تعداد ۱۰۰ عدد تخمک از هر مولد ماده شمارش شده و پس از تقسيم به چهار قسمت مساوي (تعداد ۲۵ عدد در هر قسمت) به آرامي با تخمک ساير مولدان ماده مخلوط شدند تا در نهايت، مخلوط تخمک ها در چهار قسمت مساوي به عنوان دو تكرار براي تيمار اول و دو تكرار براي تيمار دوم مورد استفاده قرار گيرند. در تيمار اول، از مايع مني چهار مولد نر (شماره ۱، ۲، ۳ و ۴) و در تيمار دوم، از مايع مني چهار مولد نر (شماره ۱، ۲، ۵ و ۶) براي باروري مخلوط تخمک‌ها به ميزان مساوي ۱۰۰ ميكروليتر به ازاي هر مولد نر استفاده گرديد. حذف تصادفي مولدان ۳ و۴ و جايگزيني آنها با مولدان ۵ و ۶ با هدف ارزياب ي ميزان تعاملات ژنتيكي بين مولدان مختلف صورت پذيرفت.

جهت حصول اطمينان از توانايي اسپرم مولدان نر مورد استفاده در لقاح دادن تخمک‌ها دو تيمار شاهد نيز درنظر

گرفته شد. درتیمار شاهد اول تخمک و اسپرم دو مولد ماده (شماره ۱ و ۴) و دو مولد نر (شماره ۳ و ۴) و در تیمار شاهد دوم تخمک و اسپرم دو مولد ماده (شماره ۳ و ۴) و دو مولد نر (شماره ۵ و ۶) به صورت انفرادي لقاح یافتند. در کلیه تیمارها از تعداد مساوي تخمک به ازاي هر مولد ماده (۱۰۰ عدد) و همچنین حجم مساوي مایع مني به ازاي هر مولد نر (۱۰۰ میکرولیتر) استفاده شد (جدول ۱). تخم هاي لقاح یافته تا مرحله جذب کامل کیسه زرده در تراف ها انکوباسیون شده و درصد لقاح و میزان تفریخ در تیمارهاي مختلف محاسبه شد. در هر تکرار، پس از جذب کیسه زرده تعداد ۱۵ آلوین به ازاي امکان تشکیل هر جفت تلاقي، نمونه برداري شده و در اتانول مطلق جهت مطالعات مولکولي تثبیت شدند. به‌طور کلي، ۱۲۰۰ آلوین از مجموع تیمارها نمونه برداري گردید. همچنین همزمان با زیست سنجي، بخشي از باله دمي مولدان جهت ردیابي مولکولي میزان قرابت آنها با فرزندان در اتانول تثبیت گردید .

جدول ۱- الگوي کلي لقاح مولدان ماهي آزاد درياي خزر در تیمارهاي مختلف تحقیق حاضر

تیمار	نحوه اختلاط گامت‌ها	نر شماره:	ماده شماره:	تعداد آلوین نمونه برداري شده (۲ تکرار)		حجم مایع مني و تعداد تخمک به ازاي هر مولد
تیمار اول	۴♂ × ۴♀	۱، ۲، ۳ و ۴	۱، ۲، ۳ و ۴	۴۸۰		۱۰۰میکرولیتر مایع مني، ۱۰۰ عدد تخمک
تیمار شاهد اول	۱♂ × ۱♀	۳	۱	مخلوط نمودن ۴ خانواده	۱۲۰	
	۱♂ × ۱♀	۳	۴			
	۱♂ × ۱♀	۴	۱			
	۱♂ × ۱♀	۴	۴			
تیمار دوم	۴♂ × ۴♀	۱، ۲، ۵ و ۶	۱، ۲، ۳ و ۴	۴۸۰		
تیمار شاهد دوم	۱♂ × ۱♀	۵	۳	مخلوط نمودن ۴ خانواده	۱۲۰	
	۱♂ × ۱♀	۵	۴			
	۱♂ × ۱♀	۶	۳			
	۱♂ × ۱♀	۶	۴			

استخراج **DNA** و واکنش زنجیره اي پلیمراز

استخراج DNA ژنومي از باله دمي مولدان و آلوین ها به روش استاندارد فنل-کلروفرم (Sambrook *et al*., 1989) انجام شد. مولدان با استفاده از ۹ جایگاه ریزماهواره (جدول ۲) تعیین ژنوتیپ شدند و نهایتاً ۳ جایگاه Str ۵۸، Str ۷۳ و Str ۵۹۱ که میزان بالاتري از تنوع ژنتیکي و وجود آلل هاي یگانه (Unique alleles) را در مولدان نشان دادند براي آنالیز ردیابي انتخاب شدند. واکنش زنجیره اي پلیمراز با استفاده از ۳۰ نانوگرم DNA در حجم نهایي ۱۵ میکرولیتر براي هر واکنش و میزان هر پرایمر ۰/٦٦µM، مقدار dNTP برابر با ۱۰۰ µM، PCR buffer با غلظت ۱ X، $MgCl_2$ برابر با ۱/۵ mM و Taq DNA polymerase برابر با ۰/۵ U و با تنظیم دماي الحاق (جدول ۲) و برنامه اجرایي دستگاه ترموسایکلر (MJ research PTC-100) (جدول ۳) بهینه گردید. مولدان و آلوین‌ها در جایگاه هاي ریزماهواره با دستگاه توالي یاب خودکار ABI PRISM® 3730 (Applied Biosystems) تعیین ژنوتیپ شدند و امتیازدهي به آلل ها با نرم افزار GeneMapper نسخه ٤ انجام شد.

جدول ۲- جايگاه هاي ريزماهواره استفاده شده براي آناليز اوليه و تعيين ژنوتيپ مولدان ماهي آزاد درياي خزر

جايگاه ريزماهواره	ترادف	شماره بانک ژني يا مرجع	دماي الحاق (°C)
Ssa ۸۵	5'-AGGTGGGTCCTCCAAGCTAC-3' 5'-ACCCGCTCCTCACTTAATC-3'	U43692	٦٠
Str ٦٠	5'-CGGTGTGCTTGTCAGGTTTC-3' 5'-GTCAAGTCAGCAAGCCTCAC-3'		۶۰
Str ۱۵	5'-TGCAGGCAGACGGATCAGGC-3 5'-AATCCTCTACGTAAGGGATTTGC-3'	(Estoup *et al.*, 1996)	۵۸
Str ۷۳	5'-CCTGGAGATCCTCCAGCAGGA-3' 5'-CTATTCTGCTTGTAACTAGACCTA-3'		۵۸
Str ۵۸	5'-AACAATGACTTTCTCTGAC-3 5'-AAGGACTTGAAGGACGAC-3'	U60223	٥٦
Str ۸۵	5'-GGAAGGAAGGGAGAAAGGT-3' 5'-GGAAAATCAATACTAACAA-3'		۵۵
Str ٥٤٣	5'-ATTCTTCGGCTTTCTCTTGC-3' 5'-ATCTGGTCAGTTTCTTTATG-3'	Presa and) (Guyomard, 1996	۵۵
Str ۵۹۱	5'-CTGGTGGCAGGATTTGA-3' 5'-CACTGTCTTTCGTTCTT-3'		۵۵
SsoSl ٤٣٨	5'-GACAACACACAACCAAGGCAC-3' 5'-TTATGCTAGGTCTTTATGCATTGT-3'	Z49134	۵۵

جدول شماره ۳- برنامه اجرايي دستگاه ترموسايكلر براي تكثير **DNA** به روش ريزماهواره

مراحل PCR	دما (درجه سانتيگراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشته سازي اوليه	۹۵	۱۰ دقيقه	۱
واسرشته سازي	۹٤	٤۵ ثانيه	
الحاق	٦٠-٥٥	۵۰ ثانيه	۳۵
بسط	۷۲	۵۰ ثانيه	
بسط نهايي	۷۲	۱۰ دقيقه	۱

رديابي والدين و اندازه جمعيت مؤثر

پارامترهاي تنوع ژنتيكي (تعداد آللها .N.A.[1]، هتروزيگوسيتي مورد انتظار He[2] و مشاهده شده Ho[3]، ظرفيت اطلاعات پلي مورفيسم (PIC[4]) و فراواني آلل-هاي خاموش (.NU) براي هر جايگاه ريزماهواره در ۱۰ مولد مورد تحقيق با استفاده از نرم افزار Cervus نسخه ۳ محاسبه شد (Kalinowski *et al.*, 2007).از ا ين نرم افزار همچنين براي تعيين قدرت رديابي والدين هنگامي كه اطلاعات ژنتيكي يكي از والدين موجود نباشد (Excl1) و يا اطلاعات ژنتيكي هر دو والد موجود باشد (Excl2) استفاده شد.

قدرت تركيبي رديابي والدين (CPE[5]) در مجموع جايگاه ها براي Excl1 و Excl2 نيز طبق روابط A و B محاسبه شد (Vandeputte et al., 2004).

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

رابطه A:
مقدار PE[6] هر جايگاه= قدرت رديابي هر جايگاه (Excl) منهاي عدد يک

رابطه B:
مقدار CPE= حاصلضرب PE تمام جايگاههاي مورد مطالعه منهاي عدد يک

ردیابی والدین بر اساس روش حذف[7] و با استفاده از ۳ جایگاه داراي بیشترین قدرت ردیابي از طریق نرم افزار FAP نسخه ۳/۵ انجام گردید (Taggart, 2007). بر پایه اطلاعات نرم افزار فوق، تعداد آلوین‌هاي 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 کاي جهت تعیین میزان انحراف تعداد آلوین هاي تولید شده توسط هر مولد ماده و نر هم به طور کلي و هم در خصوص هر جفت مولد ترکیب شده، از فرض اولیه مشارکت متعادل در سطح معني داري ۰/۰۵ استفاده شد. براي محاسبه N_e از رابطه C استفاده گردید. در این رابطه n تعداد آلوین نمونه برداري شده، Ks و Kd میانگین تعداد آلوین تولید شده توسط مولدان نر و ماده و Vs و Vd واریانس تعداد آلوین تولید شده توسط مولدان نر و ماده مي باشند (Vandeputte *et al.*, 2004).
رابطهC:

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

از آزمون T-test جهت بررسي معني داري تفاوت بین مولدان و آلوین‌ها از نظر پارامترهاي تنوع ژنتیکي در میانگین جایگاهها استفاده گردید (Horreo *et al.*, 2008).

نتايج

درصد لقاح و میزان تفریخ
میانگین درصد لقاح در تیمار اول ۱/۲±۹۲ درصد و در تیمار دوم ۱/۴±۹۰ درصد محاسبه شد که فاقد تفاوت معني دار بود. چشم زدگي تخم هاي لقاح يافته در دماي ۷ درجه سانتيگراد ۳۲ روز (۲۲۴ درجه روز) و تفريخ تخم هاي چشم زده ۳۰ روز (۲۱۰ درجه روز) به طول انجاميد و با موفقيت ۱/۹±۸۹ درصد در تيمار اول و ۱/۷±۹۰ درصد در تيمار دوم همراه بود که تفاوت معني داري نداشتند. جذب كامل كيسه زرده نيز در آلوين‌هاي تفريخ شده ۲۱۷ درجه روز طول کشيد. درصد بالاي لقاح و تفريخ بيانگر رسيدگي مناسب مولدان و موفقيت عمل تكثير و همچنين شرايط مساعد دمايي و مكاني در انكوباسيون تخم ها مي باشد.

تنوع ژنتيكي مولدان ماهي آزاد
نتايج آناليز تنوع ژنتيكي مولدان با استفاده از نه جايگاه ريزماهواره نشان داد كه .N.A از يک آلل در جايگاه٦٠ Str تا يازده آلل در جايگاه ۵۸ Str و در مجموع با ميانگين ٤/٥٥ آلل متغير بود (جدول ۴). Ho دامنه اي بين ۰/۰ در جايگاه٦٠ Str و ۱ در جايگاه ۵۸ Str داشت. He از ۰/۰ در جايگاه٦٠ Str تا ۰/۹۱۸ در جايگاه ۵۸ Str متغير بود. همچنين در خصوص سه جايگاه ريز ماهواره منتخب ۵۸ Str، ۷۳ Str و ۵۹۱ Str، ميانگين .N.A و He به ترتيب ۷ و ۰/۸ تعيين گرديد. نتايج تخمين فراواني آلل هاي خاموش در همه جايگاهها منفي بود (جدول ۴).

رديابي مولكولي والدين و فرزندان، مشاركت مولدان در توليد آلوين‌ها و اندازه جمعيت مؤثر
قدرت تركيبي رديابي والدين و فرزندان براي مجموع جايگاه ها ۰/۹۱۱ (Excl1) و ۰/۹۸۵ (Excl2) و براي سه جايگاه انتخاب شده ۰/۸۲۳ (Excl1) و ۰/۹۳٦ (Excl2) محاسبه گرديد.
جدول ۵ نتايج آناليز رديابي، دامنه مشاركت مولدان نر و ماده، N_e و N_b را در تيمارها نشان مي دهد. آناليز رديابي والدين، جفت مولد نر و ماده تشکيل دهنده بيش از ۹٦% آلوين ها را در تيمارها مشخص ساخت.

---
[6] Probability of Exclusion
[7] Exclusion

جدول ۴- تخمين پارامترهاي تنوع ژنتيكي در مولدان ماهي آزاد درياي خزر با استفاده نرم افزار **CERVUS** نسخه ۳

جايگاه	N.A.	Ho	He	PIC	Excl1	Excl2	NU.
Str ۱۵	۳	۰/۹۰۹	۰/۵۵۸	۰/٤۳۲	۰/۱٤۲	۰/۲۳۸	-۰/۲۷٤
Str ۵۸*	۱۱	۱	۰/۹۱۸	۰/۸٦٤	۰/٦۰۲	۰/۷۵۳	-۰/۰٦۹
Str ٦۰	۱	-	-	-	-	-	-
Str ۷۳*	٤	۰/٦۳٦	۰/٦۰٦	۰/٤۹۱	۰/۱۷۲	۰/۲۹۳	-۰/۰٤۵
Str ۸۵	۲	۰/۱۸۲	۰/۱۷۳	۰/۱۵۲	۰/۰۱٤	۰/۰۷٦	-۰/۰٤۰
Ssa ۸۵	٤	۰/۷۲۷	۰/۷٦٦	۰/٦۸۳	۰/۳۰۸	۰/٤۸۳	-۰/۰۰٤
SsoSl ٤۳۸	۲	۰/۰۹۱	۰/۰۹۱	۰/۰۸۳	۰/۰۰٤	۰/۰٤۲	۰/۰۱٤
Str ۵٤۳	۵	۰/٦۳٦	۰/۵۲۸	۰/٤۷۵	۰/۱٤۰	۰/۳۰٤	-۰/۱٦۲
Str ۵۹۱*	۹	۰/۹۰۹	۰/۸٤۸	۰/۷۸۷	۰/٤٦۳	۰/٦۳۷	-۰/۰٦۸
ميانگين همه جايگاه‌ها	٤/۵۵	۰/۵٦۵	۰/٤۹۸	۰/٤٤۰	-	-	-
ميانگين جايگاه‌هاي منتخب	۸	۰/۸٤۸	۰/۷۹۰	۰/۷۱٤	-	-	-

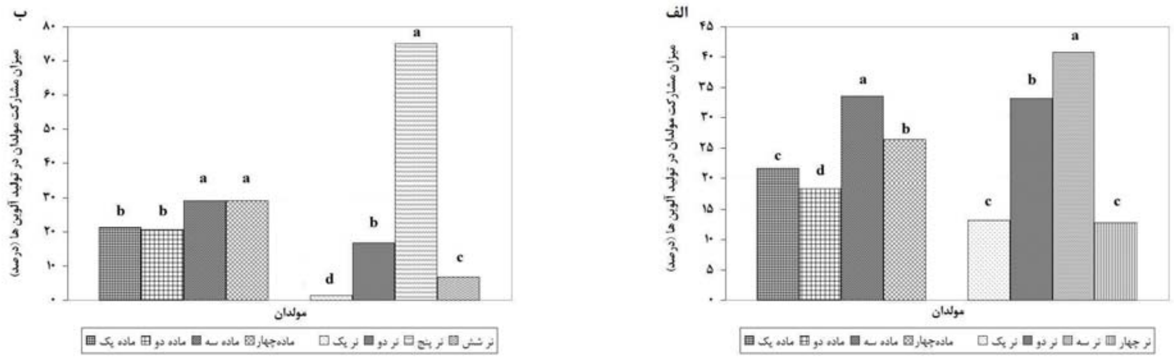
* جايگاههاي منتخب با علامت ستاره مشخص شده اند. N.A تعداد آلل ها، He هتروزيگوسيتي مورد انتظار، Ho هتروزيگوسيتي مشاهده شده، PIC ظرفيت اطلاعات پلي مورفيسم و .NU فراواني آلل هاي خاموش مي باشد.

جدول ۵- ميزان رديابي، دامنه مشاركت مولدان، اندازه جمعيت مؤثر N_e و تعداد كل مولدان مورد استفاده N_b

شاخص / تيمار	ميزان رديابي (درصد)	دامنه مشاركت مولدان: نر	دامنه مشاركت مولدان: ماده	N_e	N_b
تيمار اول	۹۹/۸	۱۲/۸۰ تا ۴۰/۸۰	۱۸/۴۰ تا ۳۳/۶۰	۶/۷۲	۸
تيمار شاهد تيمار اول	۱۰۰	-	-	۳/۹۹	٤
تيمار دوم	۹۶/۴	۱/۲۸ تا ۷۵/۱۰	۲۰/۶۰ تا ۲۹/۱۸	۴/۱۱	۸
تيمار شاهد تيمار د دوم	۱۰۰	-	-	۳/۹۸	٤

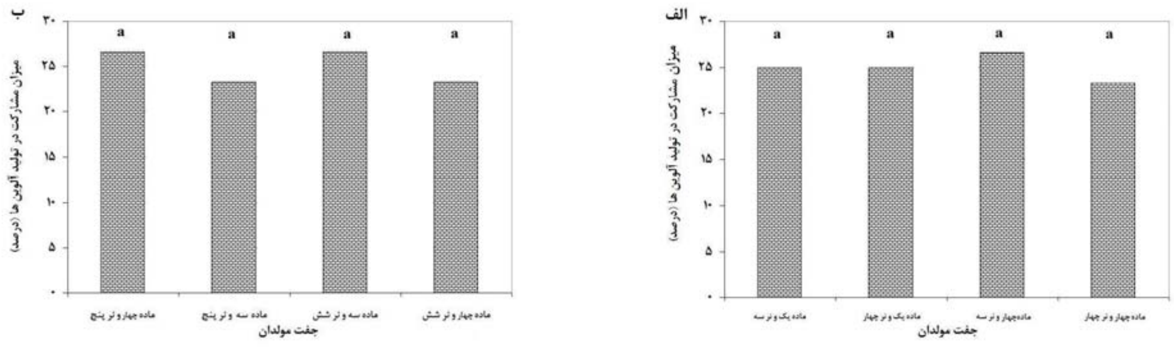
در تيمار اول ميزان كلي مشاركت در توليد آلوين‌ها در بين مولدان نر (x^2 =۱۱۶/۰۱، P <۰/۰۰۱) و در بين مولدان ماده (x^2 =۲۵/۱۲) به طور معني داري متفاوت بود. در بين مولدان نر، بيشترين ميزان مشاركت متعلق به مولد نر شماره سه با توليد بيش از ۴۰ درصد آلوين‌ها بود. دو مولد نر شماره يک و چهار هريک فقط حدود ۱۰ درصد از آلوين‌ها را توليد نمودند. در خصوص مولدان ماده نيز مولد ماده شماره سه بيشترين تعداد آلوين‌ها (۳۳/۶ درصد) و مولد ماده شماره دو كمترين تعداد آلوين‌ها (۱۸/۴ درصد) را توليد نمودند (شكل ۱ الف).

در تيمار دوم ميزان كلي مشاركت در توليد آلوين‌ها در بين مولدان نر (x^2 =۶۴۰/۶۲، P <۰/۰۰۱) و در بين مولدان ماده (x^2 =۱۱/۱۳) به طور معني‌داري متفاوت بود. در بين مولدان نر، مولد شماره پنج به تنهايي بيش از ۷۵ درصد از آلوين‌ها را توليد نمود. بر خلاف مولدان نر، مشاركت مولدان ماده در توليد آلوين‌ها متعادل‌تر بود. دو مولد ماده شماره سه و چهار هر يک با توليد حدود ۲۹ درصد از آلوين‌ها و دو مولد ماده شماره يک و دو هر يک با توليد حدود ۲۱ درصد از آلوين‌ها تفاوت معني‌داري نسبت به يكديگر نداشتند (شكل ۱ ب).



شکل ۱- مشارکت مولدان ماهي آزاد درياي خزر در توليد آلوين ها در تيمار اول (الف) و تيمار دوم (ب). حروف غير يکسان بيانگر وجود تفاوت در سطح معني داري ۰/۰۵ مي باشد.

در تيمارهاي شاهد تيمار اول و دوم تفاوت معني داري در ميزان مشارکت جفت مولداني که به صورت مجزا لقاح داده شده بودند در توليد آلوين‌ها وجود نداشت (شکل ۲ الف و ب). با توجه به نتايج حاصل از تيمارهاي شاهد، نسبت به توانايي اسپرم مولدان نر در لقاح دادن تخمک‌ها و کيفيت مناسب تخمک مولدان در تيمار اول و دوم اطمينان حاصل گرديد. توزيع متعادل آلوين‌هاي توليد شده توسط جفت مولدان مختلف در نمونه برداري، مشخص نمود که تفاوت احتمالي در ميزان زنده ماني آلوين‌هاي توليد شده توسط هر مولد طي مراحل جذب کيسه زرده ميزان کلي مشارکت مولدان در توليد آلوين ها را نسبت به حالت مشارکت متعادل، در زمان نمونه برداري تحت تأثير قرار نمي دهد.



شکل ۲- مشارکت مولدان ماهي آزاد در توليد آلوين‌ها در تيمار شاهد تيمار اول (الف) و تيمار شاهد تيمار دوم (ب)

ميزان تفاوت در مشارکت ترکيبي مولدان در توليد آلوين‌ها

در تيمار اول ميزان مشارکت بين مولدان ماده در ترکيب با مولد نر شماره ۱ (x^2=۲۴/۳۰)، شماره ۲ (x^2=۱۱/۱۳)، شماره ۳ (x^2=۲۳/۲۱) و شماره ۴ (x^2=۳۸/۰) به‌طور معني‌داري متفاوت بود. ميزان مشارکت بين مولدان نر نيز در ترکيب با مولد ماده شماره يک (x^2=۳۱/۴۸)، شماره ۲ (x^2 =۱۴/۱۷)، شماره ۳ (x^2 =۷۲/۵۰، P<۰/۰۰۱) و شماره ۴ (x^2 =۳۹/۲۵) تفاوت معني داري داشت. در تيمار دوم ميزان مشارکت بين مولدان ماده تنها در ترکيب با مولد نر شماره ۶ تفاوت معني داري داشت (x^2=۱۵/۶۵) ولي در ترکيب با ساير مولدان نر تفاوت معني داري نداشت. ميزان مشارکت بين مولدان نر نيز در ترکيب با مولد ماده شماره يک (x^2=۱۳۹/۴۲)، شماره ۲ (x^2 =۱۵۹/۰۶)، شماره ۳ (x^2 =۱۳۷/۱۴) و شماره ۴ (x^2 =۲۱۴/۱۱) تفاوت معني داري داشت.

مقایسه تنوع ژنتیکي در مولدان و آلوین هاي تولید شده

تعداد آلل ها، هتروزیگوسیتي مورد انتظار، هتروزیگوسیتي مشاهده شده و محتواي اطلاعات پلي مورفیسم در مولدان و آلوین‌ها در تیمارها در جدول ۶ ارائه گردیده است. در تیمار اول .N.A بین مولدان و آلوین‌ها در جایگاه Str ۷۳ یکسان و در دو جایگاه Str ۵۸ و Str ۵۹۱ در آلوین‌ها کمتر بود. در تیمار دوم .N.A بین مولدان و آلوین‌ها در هر سه جایگاه Str ۵۸، Str ۷۳ و Str ۵۹۱ یکسان بود. He، Ho و PIC در هر سه جایگاه ریزماهواره در تیمارهاي اول و دوم، در آلوین‌ها نسبت به مولدان کاهش معني داري نشان دادند.در تیمارهاي شاهد تیمار اول و تیمار دوم، .N.A بین مولدان و آلوین‌ها در هر سه جایگاه Str ۵۸، Str ۷۳ و Str ۵۹۱ یکسان بود. He، Ho و PIC در هر سه جایگاه ریزماهواره در تیمارهاي شاهد، در آلوین‌ها نسبت به مولدان تفاوت معني داري نشان ندادند.

بحث

کاربرد نشانگرهاي ریزماهواره در آبزي پروري و مدیریت شیلاتي در دهه گذشته رشد چشمگیري داشته است. استفاده از تعداد حداقل نشانگرهاي ریزماهواره و در عین حال دست‌یابي به درصد بالاي ردیابي والدین و فرزندان در شیوه لقاح مخلوط گامت‌ها از اهداف عمده برنامه هایي است که تکنیک ردیابي را در حفاظت از ذخایر ژنتیکي آبزیان به کار مي برند (Castro و همکاران، ۲۰۰۷؛ Martinez و Fernandez، ۲۰۰۹). در تحقیق حاضر، استفاده از تنها سه نشانگر ریزماهواره در نرم افزار FAP، با میزان بالایي از قدرت ردیابي در ماهي آزاد درياي خزر همراه بود و ٩٦/٤ تا ۱۰۰ درصد آلوین ها به مولدان نر و ماده تشکیل دهنده منتسب شدند. در میان گزارش هاي منتشر شده در زمینه استفاده از جایگاه هاي ریزماهواره براي ردیابي والدین و فرزندان، Vandeputte و همکاران در سال ۲۰۰۴، میزان ردیابي ۹۵/۳ درصد را در ماهي کپور معمولي با استفاده از هشت جایگاه ریزماهواره گزارش نمودند. در سال ۲۰۰۷ نیز Kim و همکاران انتساب ۸۴/۴ تا ۱۰۰ درصد از لاروهاي تولید شده از لقاح مخلوط ماهي کفشک قهوه اي *Pleuronectes herzensteini* را به والدین تشکیل دهنده با استفاده از پنج جایگاه ریزماهواره انجام دادند. شناسایي و استفاده از نشانگرهاي ریزماهواره داراي بیشترین تنوع ژنتیکي و بیشترین قدرت ردیابي در ماهي آزاد، عدم وجود آلل هاي خاموش در جایگاه هاي ریزماهواره استفاده شده و وجود آلل هاي یگانه (Unique alleles) در هر سه جایگاه ریزماهواره منتخب از جمله دلایل مؤثر در رسیدن به درصد بالاي ردیابي در تیمارها بود. در جایگاه Str ۵۸، ٤٥ درصد، در جایگاه Str ۷۳، ۵۵ درصد و در جایگاه Str ۵۹۱ نیز ۵۰ درصد از آلل هاي تشخیص داده شده در کل مولدان، آلل هاي یگانه بودند.

مجموع عوامل بیان شده در نهایت منجر به قدرت ترکیبي ردیابي والدین به میزان بیش از ۰/۹۳ (Excl2) در مجموع مولدان استفاده شده و ردیابي بیش از ۹۶ درصد از آلوین ها به والدین تشکیل دهنده در تیمارها گردید. در سال ۲۰۰۳، Hara و Sekino در گونه فلاندر ژاپني و در سال ۲۰۰۸، Ribeiro و همکاران در ماهي آزاد اقیانوس اطلس به وجود آلل هاي یگانه در ژنوتیپ مولدان و عدم وجود آلل هاي خاموش در جایگاه هاي ریزماهواره مورد استفاده در تعیین ژنوتیپ مولدان به عنوان عوامل مهم در موفقیت آنالیز ردیابي والدین و فرزندان اشاره مي نمایند.

جدول ٦- مقايسه تنوع ژنتيكي مولدان و آلوين هاي ماهي آزاد با سه جايگاه منتخب ريزماهواره

شاخص	جايگاه / تيمار	Str ۵۸ Br.	Str ۵۸ Al.	Str ۷۳ Br.	Str ۷۳ Al.	Str ۵۹۱ Br.	Str ۵۹۱ Al.	ميانگين Br.	ميانگين Al.
N.A	تيمار اول	۹	۸	٤	٤	۷	٦	٦/٦۷	٦
	تيمار شاهد تيمار اول	۵	۵	۲	۲	٤	٤	۳/٦۷	۳/٦۷
	تيمار دوم	۹	۹	٤	٤	۷	۷	٦/٦۷	٦/٦۷
	تيمار شاهد تيمار دوم	۷	۷	۲	۲	٦	٦	۵	۵
He	تيمار اول	۰/۹۰۸	۰/۸۲۹	۰/٦٤۲	۰/۵۷۰	۰/۸۱۷	۰/٦۹۸	[a] ۰/۷۸۹	[b] ۰/٦۹۹ ±۰/۰۱۱
	تيمار شاهد تيمار اول	۰/۸۵۷	۰/۸٤۳	۰/۵۳٦	۰/۵۲۹	۰/۷۵۰	۰/۷٤٤	[a] ۰/۷۱٤	[a] ۰/۷۰۵ ±۰/۰۰۸
	تيمار دوم	۰/۹۲۵	۰/۸۳۳	۰/٦۵۰	۰/۵۷۷	۰/۸٤۲	۰/۸۲٦	[a] ۰/۸۰٦	[b] ۰/۷۴۵ ±۰/۰۰۹
	تيمار شاهد تيمار دوم	۰/۹۳۳	۰/۹۲۸	۰/۵۳۳	۰/۵۳۰	۰/۸٤٤	۰/۸۳۹	[a] ۰/۷۷۰	[a] ۰/۷٦٦ ±۰/۰۰۲
Ho	تيمار اول	۱	۰/۹۲۸	۰/۵۰۰	۰/٤۵٦	۰/۸۷۵	۰/٤۹٤	[a] ۰/۷۹۲	[b] ۰/٦۲٦ ±۰/۰۱۵
	تيمار شاهد تيمار اول	۱	۰/۹۸۸	۰/۲۵۰	۰/۲۳٦	۰/۷۵۰	۰/۷٦۳	[a] ۰/٦٦٦	[a] ۰/٦٦۲ ±۰/۰۰۳
	تيمار دوم	۱	۰/۹۰۱	۰/٦۲۵	۰/۵۹۲	۰/۸۷۵	۰/۸٦۳	[a] ۰/۸۳۳	[b] ۰/۷۸۵ ±۰/۰۰۸
	تيمار شاهد تيمار دوم	۱	۰/۹۸۷	۰/٤۰۰	۰/٤۰۸	۰/۸۰۰	۰/۸۰۰	[a] ۰/۷۳۳	[a] ۰/۷۳۲ ±۰/۰۰۱
PIC	تيمار اول	۰/۸۳۵	۰/۸۰۷	۰/۵۲۵	۰/٤۹۷	۰/۷۳۵	۰/٦٤۹	[a] ۰/٦۹۸	[b] ۰/٦۵۱ ±۰/۰۷
	تيمار شاهد تيمار اول	۰/۷۱۲	۰/۷۰٦	۰/۳۵۹	۰/۳۵۱	۰/٦۰۵	۰/۵۸۸	[a] ۰/۵۵۹	[a] ۰/۵٤۸ ±۰/۰۰۷
	تيمار دوم	۰/۸۵۳	۰/۸۱۰	۰/۵۳۰	۰/٤۹۷	۰/۷۵۹	۰/۷۳۸	[a] ۰/۷۱٤	[b] ۰/٦۸۱ ±۰/۰۰٦
	تيمار شاهد تيمار دوم	۰/۸۲۰	۰/۸۱۰	۰/۳٦۵	۰/۳۵۷	۰/۷۳۰	۰/۷۲۵	[a] ۰/٦۳۸	[a] ۰/٦۳۱ ±۰/۰۰۳

*N.A. تعداد آلل ها، He و Ho هتروزيگوسيتي مورد انتظار و مشاهده شده و PIC ظرفيت اطلاعات پلي مورفيسم

آناليز رديابي در تيمار اول مشاركت نابرابر مولدان در توليد آلوين‌ها را در شرايط يكسان سازي حجم مايع مني و تعداد تخمک نشان داد. دو مولد نر از مجموع چهار مولد نر مورد استفاده، به تنهايي حدود ۷۵ درصد از آلوين‌ها را توليد نمودند. همچنين ميزان مشاركت تركيبي مولدان نر و ماده در توليد آلوين‌ها تفاوت معني داري داشت. مشاركت نامتعادل مولدان خصوصاً مولدان نر در توليد آلوين‌ها در اين تيمار باعث كاهش نسبت N_e/N_b به عدد ۰/۸۴ گرديد. در تيمار دوم جايگزيني مولدان نر شماره سه و چهار با مولدان نر شماره پنج و شش، ميزان مشاركت مولدان نر در توليد آلوين‌ها را شديداً نامتعادل ساخت. در بين مولدان نر، مولد شماره پنج به تنهايي بيش از ۷۵ درصد از آلوين‌ها را توليد نمود. بر خلاف مولدان نر، مشاركت مولدان ماده در توليد آلوين‌ها نسبت به تيمار اول متعادل‌تر بود و مقدار x^2 از عدد ۲۵/۱۲ در تيمار اول به عدد ۱۱/۱۳ در تيمار دوم رسيد. مشاركت بسيار نامتعادل مولدان نر در توليد آلوين‌ها در تيمار دوم باعث كاهش شديد N_e/N_b به عدد ۰/۵۱ يعني در حدود نصف تعداد كل مولدان گرديد كه وضعيت بسيار نامناسبي را در خصوص انتقال ذخيره ژني مولدان به آلوين‌هاي توليد شده ايجاد مي نمايد. در سال ۲۰۰۲، Bekkevold و همكاران در ماهي روغن و در سال ۲۰۰۵، Brown و همكاران در ماهي سيم دريايي بيان مي نمايند كه ميزان مشاركت نابرابر مولدان نر در توليد لاروها در شيوه لقاح مخلوط گامت‌ها، باعث كاهش N_e/N_b در مولدان در مراكز تكثير مصنوعي مي شود. پارامترهاي مربوط به تنوع ژنتيكي نيز كاهش معني دار تنوع ژنتيكي در آلوين‌ها را نسبت به مولدان در تيمارهاي اول و دوم نشان دادند. اين مسأله بيانگر انتقال نامناسب ذخيره ژني

مولدان به آلوين‌هاي توليد شده به دليل مشاركت نامتعادل مولدان در توليد آلوين‌ها مي باشد.

در خصوص تأثير يكسان سازي حجم مايع مني بر ميزان مشاركت مولدان نر در توليد فرزندان در لقاح مخلوط گامتها گزارش هاي متفاوتي مشاهده مي شود. در سال ۲۰۰۷، Wedekind و همكاران با بررسي ماهي *Coregonus zugensis* از خانواده آزاد ماهيان گزارش نمودند كه يكسان نكردن حجم مايع مني در هنگام لقاح مخلوط باعث كاهش اندازه جمعيت مؤثر و در نتيجه كاهش تنوع ژنتيكي آلوين هاي توليد شده مي گردد ولي يكسان سازي حجم مايع مني مورد استفاده در تكثير، مشاركت مولدان نر در توليد آلوين ها و در نتيجه تنوع ژنتيكي در نسل بعد را افزايش مي دهد. بنابر نتايج تحقيق حاضر و مقايسه با مطالعه Sourinejad *et al.*, 2010 كه N_e/N_b=۰/۵۳ را در لقاح مخلوط ۴ مولد ماده و ۴ مولد نر ماهي آزاد در شرايط حجم غير يكسان مايع مني گزارش نمودند مي توان اذعان نمود كه يكسان سازي حجم مايع مني در شيوه لقاح مخلوط ماهي آزاد درياي خزر منجر به مشاركت متعادل مولدان نر در بارورسازي تخمک‌ها و توليد آلوين ها نمي شود كه اين يافته در تناقض با مطالعه Wedekind و همكاران در سال ۲۰۰۷ مي باشد. در تطابق با تحقيق حاضر، Kaspar و همكاران در سال ۲۰۰۷ بيان مي كنند كه در ماهي كپور معمولي نيز يكسان سازي حجم مايع مني به ازاي هر یک از مولدان نر، باعث مشاركت متعادل مولدان نر در توليد فرزندان در لقاح مخلوط گامتها نمي شود.

گزارش‌هاي منتشر شده در زمينه لقاح مخلوط عمدتاً به ميزان مشاركت متغير و نامتعادل مولدان نر در اين شيوه اشاره مي نمايند. در ماهي كفشک سنگالي، تنها ۱۸ درصد مولدان نر در توليد لاروها به شيوه لقاح مخلوط مشاركت داشتند و اين مشاركت كم مولدان نر در توليد لاروها، كاهش N_e در مولدان و كاهش تنوع ژنتيكي در فرزندان را موجب گرديد (Porta *et al.*, 2006). در ماهي باس آسيايي نيز از بين ۲ مولد ماده و ۷ مولد نر مورد آزمايش، ۵۵ درصد لاروهاي توليد شده از یک مولد نر بودند (Frost *et al.*, 2006). محققان بيان مي كنند كه اختلافات زياد در ميزان مشاركت جنس نر در توليد لاروها به دليل بروز پديده رقابت اسپرم (Sperm competition) در شيوه لقاح مخلوط گامت‌ها مي باشد (Campton, 2004; Wedekind *et al.*, 2007).رقابت اسپرم بدين معني است كه در هنگام بارورسازي تخمك‌ها اسپرم چند مولد نر براي لقاح تخمک‌ها با هم به رقابت بپردازند. به نظر مي‌رسد در ماهي آزاد درياي خزر نيز رقابت اسپرم دليل اصلي مشاركت نامتعادل مولدان نر در توليد آلوين‌ها در شيوه لقاح مخلوط گامت‌ها و با حجم يكسان مايع مني باشد.

نتايج آناليز رديابي والدين و فرزندان در تيمارهاي شاهد نشان داد كه ميزان مشاركت مولدان نر و ماده در توليد آلوين‌ها متعادل مي باشد. نسبت N_e/N_b در تيمار شاهد تيمار اول ۰/۹۹۷ و در تيمار شاهد تيمار دوم ۰/۹۹۵ محاسبه گرديد. نسبت بالاي N_e/N_b بيانگر مشاركت متعادل مولدان در توليد آلوين‌ها و عدم كاهش معني دار اندازه جمعيت مؤثر در مولدان نسبت به تعداد كل مولدان مورد استفاده مي باشد كه نتيجتاً عدم كاهش معني دار تنوع ژنتيكي در آلوين‌ها نسبت به مولدان را به دنبال داشت.

در جمع‌بندي نهايي، شناسايي نشانگرهاي ريزماهواره داراي تنوع ژنتيكي بالا در ماهي آزاد درياي خزر و انجام آناليز رديابي والدين با استفاده از آنها، با درصد موفقيت بالايي در تعيين مولدان مشاركت كننده در توليد آلوين‌ها و تخمين N_e در مولدان همراه بود. نتايج آناليز رديابي والدين نشان داد كه مشاركت مولدان در توليد آلوين‌ها در شيوه لقاح مخلوط گامت‌ها با حجم يكسان مايع مني نامتعادل بوده و در اين خصوص اختلافات زيادي خصوصاً در ميزان مشاركت مولدان نر در توليد آلوين‌ها مشاهده گرديد. مشاركت نامتعادل مولدان نر و ماده در تركيب ژنتيكي آلوين‌هاي ايجاد شده، كاهش N_e در مولدان و در نتيجه كاهش تنوع ژنتيكي در فرزندان را به‌دنبال داشت. به نظر مي رسد در خصوص مولدان نر، رقابت اسپرم عامل مهمي در عدم مشاركت متعادل مولدان نر در توليد

آلوين‌ها در ماهي آزاد درياي خزر به شيوه لقاح مخلوط باشد. افزايش N_e در تكثير مصنوعي مولدان ماهي آزاد بايد از طريق متعادلتر نمودن ميزان مشاركت مولدان خصوصاً مولدان نر در تركيب ژنتيكي آلوينهاي ايجاد شده عملي گردد. اين موضوع نيازمند انجام اصلاحاتي در الگوي لقاح مولدان در مراكز تكثير از طريق بررسي بيشتر رقابت اسپرم و ارتباط آن با ساير خصوصيات كيفي اسپرم مولدان مانند غلظت و تحرک اسپرم مي باشد.

References

- Bekkevold, D., Hansen, M.M., Loeschcke, V., 2002. Male reproductive competition in spawning aggregations of cod (*Gadus morhua* L.). Molecular Ecology 11, 91-102.
- Brown, R.C., Woolliams, J.A., McAndrew, B. J., 2005. Factors influencing effective population size in commercial populations of gilthead seabream, *Sparus aurata*. Aquaculture 247, 219-225.
- Campton, D.C., 2004. Sperm competition in salmon hatcheries: the need to institutionalize genetically benign spawning protocols. Transactions of the American Fisheries Society 133, 1277-1289.
- 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 (*Sparus aurata*). Aquaculture 272, 210-216.
- 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. Molecular Marine Biology and Biotechnology 5, 295-298.
- Frost, L.A., Evans, B.S., Jerry, D.R., 2006. Loss of genetic diversity to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). Aquaculture 261, 1056-1064.
- Hara, M., Sekino, M., 2003. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* 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 (*Salmo salar*). 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 (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock. Aquaculture 220, 245-259.
- Jalali, M. A., Mojazi Amiri, B., 2009. Threatened fishes of the world: *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877) (Salmoniforms: Salmonidae). Environmental Biology of Fishes 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. Molecular Ecology 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 *Pleuronectes herzensteini* by microsatellite DNA markers. Fisheries Science 73, 1087-1093.
- Machado-Schiaffino, G., Dopico, E., Garcia-Vazquez, E., 2007. Genetic variation 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, pp. 59-112.
- Porta, J., Porta, J.M., Martinez-Rodriguez, G., Alvarez, M.D.C., 2006. Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. Aquaculture 256, 159-166.
- Presa, P., Guyomard, R., 1996. Conservation of microsatellites in three species of salmonids. Fish Biology 49, 1326-1329.
- Primack, R. B,m 1998. The problems of small populations. Essentials of conservation biology. Sinauer Associates, Sunderland, 253-276.
- Ribeiro, A., Moran, P., Caballero, A., 2008. Genetic diversity and effective size of the Atlantic salmon *Salmo salar* L. inhabiting the River Eo (Spain) following a stock collapse. Fish Biology 72, 1933-1944.

- 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., Martinez, P., 2010. Assessment of effective size of breeders and its consequence on genetic diversity of F1 progeny in current artificial breeding of Caspian trout *Salmo trutta caspius* using microsatellite markers. Modern Genetics 5 (In Persian).
- Taggart, J.B., 2007. FAP: an exclusion-based parental assignment program with enhanced predictive functions. Molecular Ecology Notes 7, 412-415.
- 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. Biological Conservation 137, 180-188.

Effect of Milt Volume Equalization in Mixed Milt Fertilization of Caspian Brown Trout *Salmo Trutta Caspius* on Genetic Contribution of Breeders to F1 Progeny

I. Sourinejad[1], M.R. Kalbassi*[2] and P. Martinez[3]
[1] Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University,I.R. Iran
[2] Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University,I.R. Iran
[3] Department of of Genetics, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Spain
(Received: 03/07/2010 , Accepted: 09/01/2012)

Abstract
Due to importance of genetic contribution of all broodstocks in artificial propagation of Caspian brown trout *Salmo trutta caspius* for increasing gene pool in future progeny, effects of milt volume equalization of broodstocks in mixed milt fertilization were assessed. (N_e) was calculated through equal gamete mating of four male and female breeders in two trearments. Assesment of genetic contribution were carried out by polymerase chain reaction using three polymorphic uniqued allel microsattelite loci (Str 591, 73, 58). Parental and progeny genotype were determined by automated ABI PRISM sequencer system and allels were scores by using Gene Mapper software. Pedigree tracing was performed in the basis of exclusion method in FAP program using three polymorphic microsatellite loci in breeders. N_e was calculated as 0.84 and 0.51 in the first and second treatment, respectively which subsequently reduced genetic diversity in alevins significantly ($P<0.05$). Equalization of milt volume and ova number not only did not result in balanced contribution of breeders, but also produced large variations in contribution to progeny, especially among males. Final results confirmed that real increasing of N_e in artificial breeding of Caspian trout breeders needs serious modifications in fertilization design of breeders in artificial breeding centers in Iran.

Keywords: Effective population size, Milt volume, Microsatellite, *Salmo trutta caspius*

*Corresponding author: Tel: +989112204336 Fax: 01226253499 E-mail:Kalbassi_m@modares.ac.ir