ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹
صفحه ۳۰-۲۱

ارزیابی اندازه جمعیت مؤثر مولدین و تأثیر آن بر تنوع ژنتیکی نسل F_1 در شیوه فعلی تکثیر مصنوعی ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

ایمان سوری نژاد[۱]، محمدرضا کلباسی[۲و۳*]، پائولینو مارتینز[۴]

۱- دانشجوی دکتری شیلات، دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، ایران
۲- دانشیار شیلات، دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، ایران
۳- مرکز تحقیق و توسعه بیوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، ایران
۴- دانشیار ژنتیک، دانشکده دامپزشکی دانشگاه USC، اسپانیا
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Kalbassi_m@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۱۹)

چکیده

بازسازی صحیح ذخایر طبیعی ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius*، نیازمند توجه جدی به حفظ تنوع ژنتیکی در تکثیر مصنوعی این گونه در معرض خطر انقراض است. در حال حاضر اطلاعی در خصوص چگونگی تأثیر شیوه فعلی تکثیر مصنوعی ماهی آزاد بر اندازه جمعیت مؤثر مولدین که پارامتری مهم در حفظ تنوع ژنتیکی نسل بعد می‌باشد در دست نیست. شیوه فعلی تکثیر مصنوعی ماهی آزاد که شامل افزودن مایع منی دو تا چهار مولد نر بر روی مخلوط تخمک همین تعداد مولد ماده می‌باشد، در قالب دو تیمار مختلف بررسی گردید. در تیمار اول تعداد دو و در تیمار دوم تعداد چهار مولد نر، امکان مشارکت در لقاح تخمک‌های چهار مولد ماده را داشتند. ردیابی والدین و نسل F_1 با استفاده از نرم افزار FAP (Family Assignment Program) پس از بررسی اولیه تنوع ژنتیکی ۹ آغازگر ریزماهواره در هشت مولد مورد تحقیق و انتخاب سه آغازگر که دارای بیشترین میزان تنوع ژنتیکی بودند، انجام شد. بیش از ۹۸ درصد از آلوین‌های تولید شده به شیوه لقاح مخلوط در هر دو تیمار به والدین خود منتسب شدند. مشارکت متفاوت مولدین نر و ماده در تولید آلوین‌ها در هر دو تیمار باعث کاهش اندازه مؤثر مولدین نسبت به تعداد واقعی مولدین و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی گردید. در تیمار دوم، تنها یکی از چهار مولد نر مورد استفاده حدود ۷۰ درصد و سه مولد دیگر مجموعاً حدود ۳۰ درصد از آلوین‌ها را تولید نمودند. به نظر می‌رسد عامل اصلی مشارکت نامتعادل مولدین نر در تولید آلوین‌ها، پدیده رقابت اسپرم در تکثیر مصنوعی این گونه باشد. بررسی بیشتر رقابت اسپرم و ارتباط آن با خصوصیات کیفی اسپرم مولدین، مدیران مراکز تکثیر را در اتخاذ الگوی لقاح مناسب جهت حفظ تنوع ژنتیکی نسل بعد یاری خواهد نمود.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی،
اندازه جمعیت مؤثر،
رقابت اسپرم،
ماهی آزاد دریای خزر،
Salmo trutta caspius

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.2.3]

مقدمه

تنوع ژنتیکی یک شاخص مهم تنوع زیست شناختی بوده و توانایی سازگاری و مقاومت را در برابر شرایط زیان آور و تغییر یافته زیست محیطی برای جوامع فراهم می‌نماید (۱۵). مشکلی که عموماً در ارتباط با تکثیر و پرورش مصنوعی آزادماهیان و سایر گونه‌هایی که برای بازسازی ذخایر طبیعی استفاده می‌شوند وجود دارد، کاهش میزان تنوع ژنتیکی در مراکز تکثیر است (۷). کاهش میزان 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، افزایش میزان آمیزش خویشاوندی و در نهایت انقراض نسل آنها را به دنبال خواهد داشت (۱۰). میزان انتقال تنوع ژنتیکی در یک جمعیت از یک نسل به نسل بعدی بر اساس اندازه جمعیت مؤثر (Effective Population Size) تعریف می‌شود (۱۳). اندازه جمعیت مؤثر Ne، تعداد واقعی مولدینی است که در یک برنامه تکثیر از میان تمامی مولدین مورد استفاده (Census size)، در تشکیل لاروها مشارکت می‌کنند. با محاسبه این عامل، مدیران مراکز تکثیر از میزان انتقال تنوع ژنتیکی مولدین به نسل F_1 آگاهی می‌یابند. در مراکز تکثیر اندازه جمعیت مؤثر به‌واسطه پارامترهای مرتبط با محیط از قبیل اتخاذ شیوه لقاح مخلوط در تکثیر (Mixed milt fertilization)(۲،۲۰) و مشارکت نابرابر والدین در تشکیل لاروها به‌خصوص میزان مشارکت متغیر جنس نر (۶،۱۱) که بر بازده تکثیر مؤثر است اغلب پایین‌تر از تعداد سرشماری شده مولدین N_c است (۱). این پارامترها مشارکت واقعی مولدین را در تولید مثل و ترکیب ژنتیکی لاروهای حاصله نسبت به تعداد کل مولدین موجود کاهش می‌دهند. در این صورت مولدین تکثیر شده، در تولید لاروها و انتقال صفات خود به نسل بعد به یک میزان مشارکت ژنتیکی نمی‌نمایند و در نتیجه میزان تنوع ژنتیکی در نسل F_1 کاهش خواهد یافت (۱،۱۰).

ماهی آزاد دریای خزر، گونه‌ای از خانواده آزاد ماهیان، از گونه‌های بومی و در معرض خطر انقراض دریای خزر بر اساس معیار IUCN می‌باشد (۴). ذخایر پر ارزش این گونه طی دهه‌های اخیر به دلیل افزایش فشار صیادی، نابودی مکان‌های تخم ریزی و تخریب زیستگاه‌ها به شدت کاهش یافته است (۱۶). عوامل مذکور منجر به کاهش شدید تکثیر طبیعی این گونه با ارزش شده است و لذا شیلات ایران به منظور حفظ و بازسازی ذخایر ماهی آزاد اقدام به صید مولدین، تکثیر مصنوعی و رهاسازی آن به رودخانه‌های منتهی به دریای خزر نموده است. طبق روند مرسوم سال‌های گذشته تاکنون جهت تکثیر مولدین ماهی آزاد از شیوه لقاح مخلوط به صورت اضافه نمودن مایع منی ۲-۴ مولد نر به صورت انفرادی بر روی مخلوط تخمک همین تعداد مولد ماده استفاده می‌شود. به نظر می‌رسد اتخاذ این شیوه، امکان مشارکت ژنتیکی متعادل همه مولدین استفاده شده در تکثیر مصنوعی ماهی آزاد را به دلایل ذکر شده فراهم نمی‌نماید. تا زمان ظهور تکنیک‌های مولکولی ردیابی والدین با استفاده از DNA، ردیابی اطلاعات مربوط به والدین و تعیین میزان مشارکت مولدین در لقاح تخمک‌ها و تولید فرزندان، در طی مراحل تفریخ و رشد برای بسیاری از گونه‌های آبزی پروری دشوار بود. جهت داشتن لاروهای دارای شناسنامه مشخص، گروه‌های لاروی می‌باید به طور جداگانه تا زمانی که بتوان آنها را با استفاده از علائم فیزیکی نشانه گذاری نمود پرورش یابند که این کار هزینه بر و زمان بر بوده و تنها در شرایط آزمایشگاهی قابل انجام است. ظهور نشانگرهای ژنتیکی با منشأ DNA خصوصاً ریزماهواره‌ها (Microsatellite)، برقراری اطلاعات مولکولی والدین و تعیین میزان تنوع ژنتیکی را ساده کرده است (۸). نشانگرهای ریزماهواره که توالی‌های کوتاه (۱-۶ جفت باز) تکرار شونده در ژنوم موجودات می‌باشند، یک نوع علائم طبیعی زیست شناختی بوده که پس از لقاح، از والدین به فرزندان منتقل می‌شوند و به دلیل توارث همبارز (Codominant)، تنوع بالا و فراوانی در ژنوم، ابزار قدرتمندی برای مطالعات ردیابی والدین می‌باشند (۳). این نشانگرها به طور موفقیت آمیزی جهت بررسی میزان مشارکت واقعی مولدین و تعیین اندازه جمعیت مؤثر در چند گونه ماهی پرورشی از جمله هالیبوت اقیانوس اطلس *Hippoglossus hippoglossus* (۸)، باس آسیایی *Lates calarifer* (۶)، کفشک سنگالی *Solea senegalensis* (۱۱) و آزاد ماهی اقیانوس اطلس

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.2.3]

Salmo salar (۷) استفاده شده‌اند. در یکی از جدیدترین تحقیقات صورت پذیرفته در آزادماهیان، مطالعه مشارکت مولدین نر و ماده ماهی آزاد اقیانوس اطلس در تولید آلوین‌ها در شیوه لقاح مخلوط و تأثیر آن بر میزان تنوع ژنتیکی با استفاده از شش آغازگر ریزماهواره، بیانگر مشارکت نامتعادل مولدین نر و ماده در آلوین‌های تولید شده بود که در نهایت باعث کاهش میزان تنوع ژنتیکی گردید (۷). با توجه به موارد مذکور و اهمیت بازسازی صحیح ذخایر ماهی آزاد دریای خزر در این تحقیق تلاش می‌گردد تا نشانگرهای ریز ماهواره دارای تنوع بالا برای مطالعات ردیابی ژنتیکی والدین و فرزندان شناسایی شده و در مرحله بعد با استفاده از تکنیک ردیابی والدین، تأثیر روش فعلی تکثیر مصنوعی ماهی آزاد دریای خزر بر میزان اندازه جمعیت مؤثر مولدین ارزیابی گردد.

مواد و روش‌ها

تکثیر مولدین، تولید آلوین ها و نمونه برداری

تکثیر مولدین در کارگاه تکثیر آزاد ماهیان کلاردشت و به روش لقاح خشک صورت پذیرفت. تخمک و اسپرم مورد نیاز برای آزمایش‌ها از چهار مولد ماده (۵۵/۷۵±٤/۵۲ cm و ۱۸۲۵±٤۹۵/٦۰gr) و چهار مولد نر (۵۷/۲۵±۳/۰۹ cm و ۲۱۵۰±۲۵۳/۳۱ gr) ماهی آزاد که در فصل تکثیر ۱۳۸۷ از رودخانه چشمه کیله تنکابن صید شده بودند، استحصال گردید. در شیوه فعلی لقاح مخلوط در کارگاه تکثیر از نسبت متغیر مولدان نر (۲ تا ۴ مولد نر) به ماده (معمولاً ۴ مولد ماده) استفاده می‌شود، لذا در این بررسی نیز تکثیر مولدین در دو تیمار مختلف (در دو تکرار همزمان) با استفاده از ۲ مولد نر در تیمار اول و ۴ مولد نر در تیمار دوم و با حجم نامساوی مایع منی و همچنین تعداد نامساوی تخمک انجام پذیرفت. تخمک چهار مولد ماده (شماره۱، ۲، ۳ و ۴) به طور کامل استحصال شده و به آرامی با هم مخلوط شدند تا در چهار قسمت مساوی به عنوان دو تکرار برای تیمار اول و دو تکرار برای تیمار دوم مورد استفاده قرار گیرند. در تیمار اول، از مایع منی دو مولد نر (شماره ۱ و ۲) و در تیمار دوم، از باقیمانده منی دو مولد نر مذکور و همچنین مایع منی دو مولد نر دیگر (شماره ۳ و ۴) برای باروری مخلوط تخمک‌ها استفاده گردید. تخم‌های لقاح یافته در تیمارهای مختلف تا مرحله جذب کامل کیسه زرده انکوباسیون شده و درصد لقاح و میزان تفریخ در تیمارهای مختلف محاسبه شد. در هر تکرار، پس از جذب کیسه زرده تعداد حداقل ۱۵ آلوین به ازای امکان تشکیل هر جفت تلاقی، نمونه برداری شده و در اتانول مطلق جهت مطالعات مولکولی تثبیت شدند. به‌طور کلی، ۲۵۰ آلوین از تیمار اول و ۵۰۰ آلوین از تیمار دوم نمونه برداری گردیدند. همچنین همزمان با زیست سنجی اولیه مولدین بخشی از باله دمی آنها در اتانول مطلق جهت تجزیه مولکولی تثبیت گردید.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

DNA ژنومی از باله دمی مولدین به روش استاندارد فنل-کلروفرم (۱٤) و از آلوین کامل به روش Chelex® Resin (۱۹) در آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه Santiago de Compostela کشور اسپانیا استخراج شد. مولدین با استفاده از ۹ آغازگر ریزماهواره (جدول ۱) تعیین ژنوتیپ شدند و نهایتاً ۳ آغازگر Str ۵۸، Str ۷۳ و Str ۵۹۱ که میزان بالاتری از تنوع ژنتیکی را در ماهی آزاد دریای خزر نشان دادند به منظور تجزیه ردیابی والدین در تیمارها انتخاب شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از ۳۰ نانوگرم DNA در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر برای هر واکنش و میزان هر آغازگر ۰/٦٦µM، مقدار dNTP برابر با ۱۰۰ µM، PCR buffer با غلظت ۱ X، MgCl2 برابر با ۱/۵ mM و Taq DNA polymerase برابر با ۰/۵ U (۵۹۱ Str برابر با ۱ U) و با تغییر دامنه حرارتی و تنظیم دمای الحاق مطابق جدول ۱ و برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر (MJ research PTC-100) مطابق جدول ۲ بهینه گردید. ژنوتیپ مولدین و آلوین‌های تولید شده در آغازگرهای ریزماهواره با استفاده از دستگاه توالی‌یاب خودکار ABI PRISM® 3730 (Applied Biosystems) به دست آمد و امتیازدهی به آلل‌ها با نرم افزار GeneMapper نسخه ٤ انجام شد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.2.3]

جدول شماره ۱- آغازگرهای ریزماهواره استفاده شده در تجزیه اولیه و تعیین ژنوتیپ مولدین ماهی آزاد دریای خزر

آغازگر	ترادف	شماره بانک ژنی یا مرجع	دمای الحاق(^{o}C)
Ssa ۸۵	5'-AGGTGGGTCCTCCAAGCTAC-3' 5'-ACCCGCTCCTCACTTAATC-3'	U43692	٦٠
Str ٦٠	5'-CGGTGTGCTTGTCAGGTTTC-3' 5'-GTCAAGTCAGCAAGCCTCAC-3'	(٥)	۶۰
Str ١٥	5'-TGCAGGCAGACGGATCAGGC-3 5'-AATCCTCTACGTAAGGGATTTGC-3'		٥٨
Str ٧٣	5'-CCTGGAGATCCTCCAGCAGGA-3' 5'-CTATTCTGCTTGTAACTAGACCTA-3'		٥٨
Str ٥٨	5'-AACAATGACTTTCTCTGAC-3 5'-AAGGACTTGAAGGACGAC-3'	U60223	٥٦
Str ٨٥	5'-GGAAGGAAGGGAGAAAGGT-3' 5'-GGAAAATCAATACTAACAA-3'	(١٢)	٥٥
Str ٥٤٣	5'-ATTCTTCGGCTTTCTCTTGC-3' 5'-ATCTGGTCAGTTTCTTTATG-3'		٥٥
Str ٥٩١	5'-CTGGTGGCAGGATTTGA-3' 5'-CACTGTCTTTCGTTCTT-3'		٥٥
SsoSl ٤٣٨	5'-GACAACACACAACCAAGGCAC-3' 5'-TTATGCTAGGTCTTTATGCATTGT-3'	Z49134	٥٥

جدول شماره ۲- 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	۹٤	٤٥ ثانیه	۳۵
الحاق	٥٥-٦٠	٥٠ ثانیه	
بسط	۷۲	٥٠ ثانیه	
بسط نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.2.3]

ردیابی والدین و اندازه جمعیت مؤثر

پارامترهای تنوع ژنتیکی (تعداد آلل‌ها [1]N.A.، هتروزیگوسیتی مورد انتظار [2]He و مشاهده شده [3]Ho، ظرفیت اطلاعات پلی مورفیسم ([4]PIC)) و فراوانی آلل‌های خاموش (NU.) برای هر آغازگر ریزماهواره در ۸ مولد مورد تحقیق با استفاده از نرم افزار CERVUS نسخه ۳ محاسبه شد (۹). قدرت ردیابی والدین هنگامی که اطلاعات ژنتیکی یکی از والدین موجود نباشد (Excl1) و یا اطلاعات ژنتیکی هر دو والد موجود باشد (Excl2) با استفاده از نرم افزار CERVUS نسخه ۳ تعیین گردید. قدرت ترکیبی ردیابی والدین ([5]CPE) در مجموع آغازگرها برای Excl1 و Excl2 نیز طبق روابط A و B محاسبه شد (۱۸).

رابطه A: مقدار [6]PE هر آغازگر= قدرت ردیابی هر آغازگر (Excl) منهای عدد یک

رابطه B: مقدار CPE= حاصلضرب PE تمام آغازگرهای مورد مطالعه منهای عدد یک

ردیابی والدین بر اساس روش حذف[7] و با استفاده از ۳ آغازگر دارای بیشترین قدرت ردیابی از طریق نرم افزار FAP نسخه ۳/۵ انجام گردید (۱۷). بر پایه اطلاعات نرم افزار 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.

رابطه C: $(N_e) = 4(n-2) / ((Ks+Vs/Ks) + (Kd+Vd/Kd) - 2)$

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 (۱۸). از آزمون T-test جهت بررسی معنی‌داری تفاوت بین مولدان و آلوین‌ها از نظر پارامترهای تنوع ژنتیکی در میانگین آغازگرها استفاده گردید (۷).

نتایج

درصد لقاح و میزان تفریخ

میانگین درصد لقاح در تحقیق حاضر در تیمار اول ۱/۶±۹۱ درصد و در تیمار دوم ۱/۴±۹۲ درصد محاسبه شد که فاقد تفاوت معنی‌دار بود (P>۰/۰۵). چشم زدگی تخم‌های لقاح یافته در دمای ۷ درجه سانتیگراد ۳۲ روز و تفریخ تخم‌های چشم زده ۳۰ روز به طول انجامید و با موفقیت ۱/۷±۸۹ درصد در تیمار اول و ۱/۲±۹۰ درصد در تیمار دوم همراه بود که تفاوت معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵). جذب کامل کیسه زرده آلوین‌ها نیز ۳۱ 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 می‌باشد.

تنوع ژنتیکی مولدین ماهی آزاد

نتایج تجزیه تنوع ژنتیکی مولدین با استفاده از ۹ آغازگر ریزماهواره نشان داد که تعداد آلل‌ها در مولدین از یک آلل در آغازگرهای Str ٦٠ و SsoSl ٤٣٨ تا ۹ آلل در آغازگر Str ۵۸ و با میانگین ٤ آلل متغیر بود (جدول ۳). هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار دامنه‌ای بین صفر در آغازگرهای Str ٦٠ و SsoSl ٤٣٨ تا یک و ۰/۹۰۸ در آغازگر Str ۵۸ داشت. میزان بیشتر هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به مورد انتظار (Heterozygosity excess) خصوصاً در مورد آغازگر Str ۱۵ به دلیل تعداد کم (هشت قطعه) مولدین تجزیه شده می‌باشد. بر اساس نتایج تجزیه تنوع ژنتیکی مولدین، سه آغازگر Str ۵۸، Str ۷۳ و Str ۵۹۱ جهت ردیابی والدین انتخاب شدند. میانگین تعداد آلل‌ها و هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای این سه آغازگر به ترتیب ۷ و ۰/۸ بود. نتایج تخمین فراوانی آلل‌های خاموش در همه آغازگرها منفی بود (جدول ۳).

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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.2.3]

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

آغازگر	N.A.	Ho	He	PIC	Excl1	Excl2	NU.
Str ۱۵	۳	۰/۸۷۵	۰/۵۷۵	۰/٤٤۷	۰/۱٤٥	۰/۲٥۲	-۰/۲٦۹
*Str ٥۸	۹	۱	۰/۹۰۸	۰/۸۳٥	۰/٥٤۳	۰/۷۰٦	-۰/۰۷۷
Str ٦۰	۱	–	–	–	–	–	–
*Str ۷۳	٤	۰/٦۲٥	۰/٦٥۰	۰/٥۳۰	۰/۱۹٥	۰/۳۲۹	-۰/۰۹۳
Str ۸٥	۲	۰/۱۲٥	۰/۱۲٥	۰/۱۱۰	۰/۰۰۷	۰/۰٥٥	-۰/۰٤٦
Ssa ۸٥	٤	۰/۷٥۰	۰/۷۷٥	۰/٦۷٥	۰/۳۰۱	۰/٤۷۲	-۰/۰٤۰
SsoSl ٤۳۸	۱	–	–	–	–	–	–
Str ٥٤۳	٤	۰/٥۰۰	۰/٤٤۲	۰/۳۸۷	۰/۰۹۰	۰/۲۳۳	-۰/۱٥۲
*Str ٥۹۱	۸	۰/۸۷٥	۰/۸٤۲	۰/۷٦٦	۰/٤۳۱	۰/٦۱۱	-۰/۰٥۳
میانگین تمام آغازگرها	٤	۰/٥۲۷	۰/٤۷۹	۰/٤۱٦	–	–	
میانگین آغازگرهای منتخب	۷	۰/۸۳۳	۰/۸۰۰	۰/۷۱۰	–	–	

آغازگرهای انتخاب شده با علامت ستاره مشخص شده‌اند. N.A تعداد آلل‌ها، He هتروزیگوسیتی مورد انتظار، Ho هتروزیگوسیتی مشاهده شده، PIC ظرفیت اطلاعات پلی مورفیسم و .NU فراوانی آلل‌های خاموش می‌باشد.

ردیابی قرابت والدین

قدرت ترکیبی ردیابی والدین برای مجموع آغازگرها ۰/۸۸۶ (Excl1) و ۰/۹۷۸ (Excl2) و برای سه آغازگر انتخاب شده ۰/۷۹۰ (Excl1) و ۰/۹۲۳ (Excl2) در مولدین استفاده شده بود، هرچند قدرت واقعی ردیابی والدین در تیمار اول به دلیل استفاده از تنها ۲ مولد نر طبیعتاً بیشتر از مقدار ذکر شده می‌باشد. تجزیه ردیابی والدین در خصوص آلوین‌های تولید شده، جفت مولد نر و ماده تشکیل دهنده ۹۸/۴ درصد از آلوین‌های تولید شده در تیمار اول و ۹۸/۸ درصد از آلوین‌های تولید شده در تیمار دوم را مشخص ساخت.

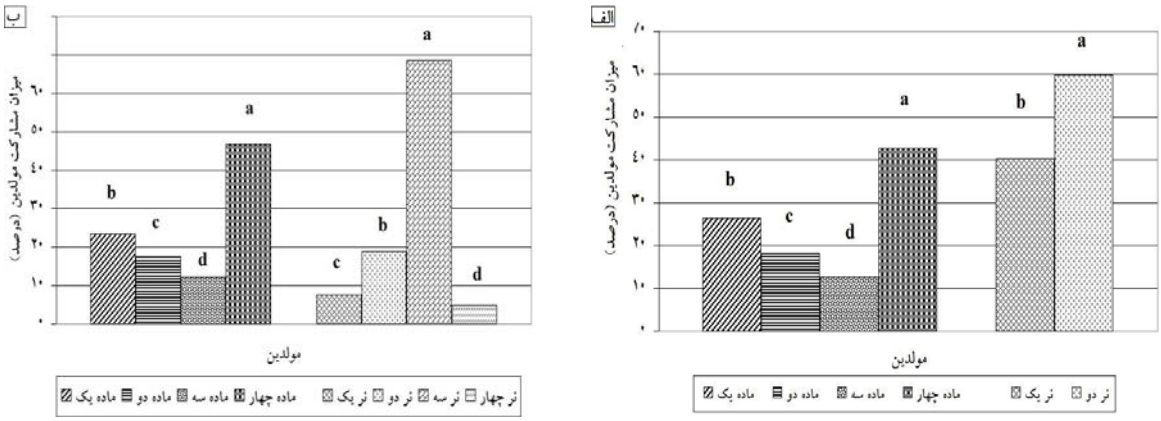
مشارکت مولدین در تولید آلوین‌ها و اندازه جمعیت مؤثر

در تیمار اول مولد نر شماره دو ۵۹/۷۶ درصد و مولد ماده شماره چهار ۴۲/۶۹ درصد از آلوین‌ها را تولید نمودند. میزان کلی مشارکت در تولید آلوین‌ها در بین مولدین نر (x^2=۹/۳۶ ،P=۰/۰) و در بین مولدین ماده (x^2=۵۰/۵۲ ،P=۰/۰) به طور معنی‌داری متفاوت بود (شکل ۱). میزان مشارکت همچنین بین مولدین ماده در ترکیب با مولد نر شماره یک (x^2 =۳۱/۸۶ ،P=۰/۰) و در ترکیب با مولد نر شماره دو متفاوت بود (x^2 =۲۶/۷۴ ،P =۰/۰). علاوه بر این، میزان مشارکت بین مولدین نر در ترکیب با مولد ماده شماره یک متفاوت (x^2 =۱۲/۹۳ ،P =۰/۰) اما در ترکیب با مولدین ماده شماره دو، سه و چهار فاقد تفاوت معنی‌دار بود (P≥۰/۰۵). تفاوت در میزان مشارکت مولدین ماده و نر در تولید آلوین‌ها باعث کاهش N_e به ۴/۶۹ در این تیمار در مقایسه با N_c برابر با ۶ گردید.

در تیمار دوم میزان کلی مشارکت در تولید آلوین‌ها در بین مولدین نر (x^2=۵۲۲/۹۲ ،P=۰/۰) و در بین مولدین ماده (x^2=۱۳۷/۴۶ ،P=۰/۰) به طور معنی‌داری متفاوت بود. در بین مولدین نر، مولد نر شماره سه بیش از ۶۸ درصد آلوین‌ها و در بین مولدین ماده، مولد ماده شماره چهار بیش از ۴۶ درصد آلوین‌ها را تولید نمود (شکل ۱).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.2.3]



شکل ۱- (الف) میزان مشارکت مولدین در تولید آلوین‌های ماهی آزاد دریای خزر در تیمار اول با دو مولد نر و چهار مولد ماده و (ب) میزان مشارکت مولدین در تولید آلوین‌های ماهی آزاد دریای خزر در تیمار دوم با چهار مولد نر و چهار مولد ماده

میزان مشارکت همچنین بین مولدین ماده در ترکیب با مولد نر شماره ۱ (x^2=۱۰/۲۱، P=۰/۰۱)، شماره ۲ (x^2 =۸/۱۱، P=۰/۰۴)، شماره ۳ (x^2=۱۱۶/۸۷، P=۰/۰) و شماره ۴ (x^2 =۱۰/۳۳، P=۰/۰۱) به‌طور معنی‌داری متفاوت بود. میزان مشارکت بین مولدین نر نیز در ترکیب با مولد ماده شماره یک (x^2=۱۲۰/۸۲، P=۰/۰)، شماره ۲ (x^2 =۸۰/۱۲، P=۰/۰)، شماره ۳ (x^2 =۴۸/۹۳، P=۰/۰) و شماره ۴ (x^2 =۲۸۰/۰۴، P=۰/۰) تفاوت معنی‌داری داشت. تفاوت زیاد در میزان مشارکت مولدین ماده و نر در تولید آلوین‌ها باعث کاهش شدید N_e به ۴/۲۵ در این تیمار در مقایسه با N_c برابر با ۸ گردید.

مقایسه تنوع ژنتیکی در مولدین و آلوین‌های تولید شده

پارامترهای تنوع ژنتیکی مولدین و آلوین‌ها در تیمار اول در جدول ۴ ارائه گردیده است. تعداد آلل‌ها بین مولدین و آلوین‌ها در هر سه آغازگر یکسان بود. هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده و ظرفیت اطلاعات پلی مورفیسم در هر سه آغازگر ریزماهواره مورد بررسی در آلوین‌ها نسبت به والدین کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده و ظرفیت اطلاعات پلی مورفیسم در والدین به ترتیب ۰/۸۰۸، ۰/۸۳۳ و ۰/۷۰۲ و در آلوین‌ها به ترتیب ۰/۰۰۹± ۰/۷۱٤، ۰/۰۱٤± ۰/۷۳۹و ۰/۰۱۰± ۰/٦٦۲ بود (جدول ٤).

پارامترهای تنوع ژنتیکی مولدین و آلوین‌ها در تیمار دوم در جدول ۵ ارائه شده است. تعداد آلل‌ها بین مولدین و آلوین‌ها در دو آغازگر Str ۵۸ و Str ۷۳ یکسان بود ولی در آغازگر Str ۵۹۱ در آلوین‌ها نسبت به مولدین کمتر بود. هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده و ظرفیت اطلاعات پلی مورفیسم در هر سه آغازگر مورد بررسی در آلوین‌ها نسبت به والدین کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده و ظرفیت اطلاعات پلی مورفیسم در والدین به ترتیب ۰/۸، ۰/۸۳۳ و ۰/۷۱۰ و در آلوین‌ها به ترتیب ۰/۰۰۹± ۰/۶۸۴، ۰/۰۱۱± ۰/۷۲۳ و ۰/۰۰۸± ۰/۶۳۰ بود.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.2.3]

جدول ٤- تخمین پارامترهای تنوع ژنتیکی در مولدین و آلوین‌های ماهی آزاد دریای خزر با ۳ آغازگر منتخب ریزماهواره در تیمار اول

	N.A.*		He		Ho		PIC	
آغازگر	والدین	آلوین ها	والدین	آلوین ها	والدین	آلوین ها	والدین	آلوین ها
Str ۵۸	۸	۸	۰/۹۲٤	۰/۸۲۷	۱	۰/۸۸۶	۰/۸۳۰	۰/۷۹۵
Str ۷۳	٤	٤	۰/٦۸۲	۰/٦۲۸	۰/٦٦۷	۰/٦٤۲	۰/۵۵۹	۰/۵۵۰
Str ۵۹۱	٦	٦	۰/۸۱۸	۰/٦۸۹	۰/۸۳۳	۰/٦۹۱	۰/۷۱۹	۰/٦٤۳
میانگین	٦	٦	[a]۰/۸۰۸	[b]۰/۷۱٤ ±۰/۰۰۹	[a]۰/۸۳۳	[b]۰/۷۳۹ ±۰/۰۱٤	[a]۰/۷۰۲	[b]۰/٦٦۲ ±۰/۰۱۰

*. N.A تعداد آلل‌ها، He هتروزیگوسیتی مورد انتظار، Ho هتروزیگوسیتی مشاهده شده و PIC ظرفیت اطلاعات پلی مورفیسم می‌باشد.

جدول ۵- تخمین پارامترهای تنوع ژنتیکی در مولدین و آلوین‌های ماهی آزاد دریای خزر با ۳ آغازگر منتخب ریزماهواره در تیمار دوم

	N.A.*		He		Ho		PIC	
آغازگر	والدین	آلوین ها	والدین	آلوین ها	والدین	آلوین ها	والدین	آلوین ها
Str ۵۸	۹	۹	۰/۹۰۸	۰/۸۱۲	۱	۰/۹۳۵	۰/۸۳۵	۰/۷۹۱
Str ۷۳	٤	٤	۰/٦۵۰	۰/۵۵۷	۰/٦۲۵	۰/۵۵۳	۰/۵۳۰	۰/٤٦۵
Str ۵۹۱	۸	۷	۰/۸٤۲	۰/٦۸۵	۰/۸۷۵	۰/٦۸۳	۰/۷٦٦	۰/٦۳۵
میانگین	۷	٦/٦٦	[a]۰/۸	[b]۰/۶۸۴ ±۰/۰۰۹	[a]۰/۸۳۳	[b]۰/۷۲۳ ±۰/۰۱۱	[a]۰/۷۱۰	[b]۰/٦۳۰ ±۰/۰۰۸

*. N.A تعداد آلل‌ها، He هتروزیگوسیتی مورد انتظار، Ho هتروزیگوسیتی مشاهده شده و PIC ظرفیت اطلاعات پلی مورفیسم می‌باشد.

بحث

استفاده از تعداد حداقل نشانگرهای ریزماهواره و در عین حال دست‌یابی به میزان بالای قدرت ردیابی والدین در شیوه لقاح مخلوط گامت‌ها از اهداف عمده برنامه‌هایی است که تکنیک ردیابی والدین را در حفاظت از ذخایر ژنتیکی آبزیان به کار می‌برند (۳). در تحقیق حاضر، این تکنیک موفقیت بیش از ۹۸ درصد را در ماهی آزاد دریای خزر با استفاده از تنها سه آغازگر ریزماهواره نشان داد. شناسایی و استفاده از نشانگرهای دارای بیشترین تنوع ژنتیکی در ماهی آزاد که بر اساس تجزیه اولیه تعداد زیادی از نشانگرهای ریزماهواره گزارش شده در آزاد ماهیان تعیین شده بودند و همچنین عدم وجود آلل‌های خاموش در آغازگرهای استفاده شده در مولدان از جمله دلایل مؤثر در رسیدن به درصد بالای ردیابی در تیمارها بود (۱۱). از دیگر عوامل مؤثر در رسیدن به قدرت ردیابی بالا در این تکنیک، وجود آلل‌های یگانه (Unique alleles) در هر سه آغازگر ریزماهواره در مولدین استفاده شده بود. در آغازگر Str ۵۸، ۵۶ درصد از آلل‌های تشخیص داده شده، آلل‌های یگانه بودند که فقط در یک مولد وجود داشتند. در آغازگر Str ۷۳، ۵۰ درصد و در آغازگر Str ۵۹۱ نیز ۶۳ درصد از آلل‌ها، آلل‌های یگانه بودند.

نگهداری سطح بالای تنوع ژنتیکی و سطح پایین آمیزش خویشاوندی از هدف‌های اصلی در برنامه‌های حفاظت تنوع ژنتیکی (Conservation programs) می‌باشد (٦). در ماهی آزاد دریای خزر نتایج ردیابی والدین مؤید مشارکت نابرابر مولدین در تولید آلوین‌ها در هر دو تیمار مورد بررسی بود. در تیمار اول، مشارکت کلی مولد نر شماره دو حدود ۲۰ درصد بیشتر از مولد نر اول بود و در بین مولدین ماده نیز مولد شماره ۴ بیش از ۴۲ درصد آلوین‌ها را تولید نمود. مشارکت نامتعادل مولدین در این تیمار باعث کاهش N_e/N_c به ۰/۷۸ گردید. در تیمار دوم نیز مولد

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.2.3]

نر شماره سه حدود ۷۰ درصد و در بین مولدین ماده نیز مولد شماره ۴ حدود ۴۷ درصد آلوین‌ها را تولید نمود. مشارکت بسیار نامتعادل مولدین در این تیمار باعث کاهش شدید N_e/N_c به ۰/۵۳ یعنی در حدود نصف اندازه سرشماری شده مولدین گردید.

کاهش N_e در مولدین که کاهش تنوع ژنتیکی در فرزندان را به دنبال دارد به عنوان یک بحران در مراکز تکثیر مصنوعی ماهیان مطرح می‌باشد (۱،٦). تحقیقات صورت گرفته در ماهی باس آسیایی (۶)، کفشک سنگالی (۱۱) و آزاد ماهی اقیانوس اطلس (۷) نیز بر این نکته دلالت دارند که عدم مشارکت یکسان همه مولدین شرکت داده شده در تکثیر به شیوه لقاح مخلوط، موجب کاهش N_e در مولدین و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی در آلوین‌ها می‌شود. در تطابق با کاهش N_e، دیگر پارامترهای تنوع ژنتیکی از قبیل هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده و ظرفیت اطلاعات پلی مورفیسم نیز دارای کاهش معنی‌دار در آلوین‌ها نسبت به مولدین بودند. کاهش تنوع ژنتیکی از مولدان به آلوین‌ها در تطابق با تحقیق Porta و همکاران در کفشک سنگالی (۱۱) و تحقیق Jackson و همکاران در هالیبوت اقیانوس اطلس (۸) بوده و به دلیل عدم مشارکت متعادل مولدان در تولید فرزندان و انتقال نامناسب ذخیره ژنی به آنها در شیوه لقاح مخلوط گامت‌ها اتفاق می‌افتد.

بررسی میزان مشارکت مولدان در تولید آلوین‌ها در تیمارهای اول و دوم نشان می‌دهد که در تیمار دوم با اضافه نمودن دو مولد نر جدید و افزایش تعداد مولدین از دو به چهار عدد، اختلافات بسیار شدیدی در میزان مشارکت مولدان نر نسبت به میزان مشارکت مولدان ماده به وقوع پیوست به طوری که یکی از مولدین به تنهایی حدود ۷۰ درصد و سه مولد دیگر در مجموع حدود ۳۰ درصد از آلوین‌ها را تولید نمودند. دیگر گزارش‌های منتشر شده در زمینه لقاح مخلوط نیز عمدتاً به میزان مشارکت متغیر و نامتعادل مولدان نر در این شیوه اشاره می‌نمایند. در ماهی کفشک سنگالی، تنها ۱۸ درصد مولدین نر در تولید لاروها به شیوه لقاح مخلوط مشارکت داشتند و این مشارکت کم مولدین نر در تولید لاروها، کاهش N_e در مولدین و کاهش تنوع ژنتیکی در فرزندان را موجب گردید (۱۱). در ماهی باس آسیایی نیز از بین ۲ مولد ماده و ۷ مولد نر مورد آزمایش، ۵۵ درصد لاروهای تولید شده از یک مولد نر بودند. محققان بیان می‌کنند که اختلافات زیاد در میزان مشارکت جنس نر در تولید لاروها به دلیل بروز پدیده رقابت اسپرم (Sperm competition) در شیوه لقاح مخلوط گامت‌ها می‌باشد (۲،۲۰). رقابت اسپرم بدین معنی است که در هنگام بارورسازی تخمک‌ها اسپرم چند مولد نر برای لقاح تخمک‌ها با هم به رقابت بپردازند. به نظر می‌رسد در ماهی آزاد دریای خزر نیز رقابت اسپرم دلیل اصلی مشارکت نامتعادل مولدین نر در تولید آلوین‌ها در شیوه لقاح مخلوط گامت‌ها و با حجم نامساوی مایع منی باشد. بررسی دقیق‌تر پدیده رقابت اسپرم در شرایط یکسان سازی حجم مایع منی به ازای هر مولد نر به‌عنوان موضوع مهمی برای تحقیقات آینده پیشنهاد می‌شود. در دیگر تحقیقات صورت پذیرفته در ماهی باس آسیایی (۶)، کفشک سنگالی (۱۱) و ماهی هالیبوت اقیانوس اطلس (۸) که گونه‌هایی با لقاح جمعی (Mass spawning) هستند نیز با وجود حجم نامساوی مایع منی و تعداد نامساوی تخمک به ازای هر مولد نر و ماده، رقابت اسپرم به عنوان عامل احتمالی نامتعادل شدن مشارکت مولدان نر بیان گردید. عمده تحقیقات صورت پذیرفته در زمینه ردیابی والدین و فرزندان در آبزی پروری، بر مشارکت متغیر مولدان نر در تولید فرزندان تأکید داشته‌اند اما نگاهی عمیق‌تر به نتایج به دست آمده در تحقیق پیش رو نشان می‌دهد که مشارکت مولدان ماده نیز هر چند به میزان کمتر نسبت به مولدان نر، نامتعادل بود. مشارکت نامتعادل مولدان ماده در تولید آلوین‌ها که بر کاهش N_e در تیمارها تأثیرگذار بود، احتمالاً به دلیل تعداد نامساوی تخمک‌های استفاده شده به ازای هر مولد می‌باشد. همانگونه که بیان گردید در شیوه فعلی تکثیر مصنوعی ماهی آزاد که تحقیق پیش رو مطابق آن تنظیم شده بود گامت‌های استحصال شده از مولدان نر و ماده بدون در نظر گرفتن حجم مایع منی و تعداد تخمک به ازای هر مولد به شیوه مخلوط لقاح داده می‌شوند. در نتیجه، تعداد نابرابر تخمک‌ها می‌تواند منجر به تفاوت در تعداد آلوین‌های تولید شده به ازای هر مولد ماده شده و منجر به کاهش N_e گردد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.2.3]

در جمع‌بندی نهایی، شناسایی نشانگرهای ریزماهواره دارای تنوع ژنتیکی بالا در ماهی آزاد دریای خزر و انجام تجزیه ردیابی والدین با استفاده از آنها، با درصد موفقیت بالایی در تعیین مولدین مشارکت کننده در تولید آلوین‌ها و تخمین N_e در مولدین همراه بود. نتایج تجزیه ردیابی والدین نشان داد که مشارکت مولدین در تولید آلوین‌ها در شیوه لقاح مخلوط گامت‌ها نامتعادل بوده و در این خصوص اختلافات زیادی خصوصاً در میزان مشارکت مولدین نر در تولید آلوین‌ها مشاهده گردید. مشارکت نامتعادل مولدین نر و ماده در ترکیب ژنتیکی آلوین‌های ایجاد شده، کاهش N_e در مولدین و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی در فرزندان را به‌دنبال داشت. به نظر می‌رسد در خصوص مولدان نر، رقابت اسپرم عامل مهمی در عدم مشارکت یکسان مولدین در تولید آلوین‌ها در ماهی آزاد دریای خزر به شیوه لقاح مخلوط باشد. بررسی بیشتر رقابت اسپرم و ارتباط آن با خصوصیات کیفی اسپرم مولدین در شرایط یکسان سازی حجم مایع منی به ازای هر مولد نر، مدیران مراکز تکثیر را در اتخاذ الگوی لقاح مناسب و کنترل بهتر عوامل کاهش دهنده N_e در مولدین و در نتیجه کاهش دهنده تنوع ژنتیکی نسل بعد یاری خواهد نمود.

منابع

1. 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

2. 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

3. 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

4. Coad BW (2000) Criteria for assessing the conservation status of taxa (as applied to Iranian freshwater fishes). Biologia, 55(5):539–557

5. 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

6. 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

7. 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

8. 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, 220:245-2599. 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

10. Machado-Schiaffino G, Dopico E, Garcia-Vazquez E (2007) Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. Aquaculture, 264:59-65

11. 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

12. Presa P, Guyomard R (1996) Conservation of microsatellites in three species of salmonids. Fish Biology, 49:1326–1329

13. Primack R B (1998) The problems of small populations. Essentials of conservation biology. Sinauer Associates, Sunderland, 253-276

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

15. Snyder N F R, Derrickson S R, Beissinger S R, Wiley J W, Smith T B, Toone W D, Miller B (1996) Limitations of captive breeding in endangered species recovery. Conservation Biology, 10:338-348

16. Sonstebo J H, Borgstrom R, Heun M (2007) Genetic structure of brown trout (*salmo trutta*) from the Hardangervidda mountain plateau (Norway) analyzed by microsatellite DNA: a basis for conservation guidelines. Conservation Genetics, 8:33- 44

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

18. 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

19. Walsh P S, Metzger D A, Higuchi R (1991) Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques, 10:506–513

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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.2.3]