فصل اول

کلیات

مقدمه

پرورش ماهیان سردآبی در کشور جمهوری اسلامی ایران در طی ۱۰ سال گذشته از رشد مضاعف برخودار بوده به نحوی که بنا بر گزارش شیلات ایران از ۵۰۰ تن به حدود ۶۲۶۳۰ تن در سال ۸۷ رسیده است (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۸۸). علی رغم این افزایش تولید، در طی سال های اخیر به دلیل افزایش نیاز به بچه ماهی و بر اساس گزارش های سفر کارشناسان خارجی به ایران وگزارش های مراکز تکثیر استان ها و همچنین براساس نتایج پروژه های تحقیقاتی مرتبط صورت گرفته، وضعیت مسائل و مشکلات ژنتیکی ماهی قزل آلای رنگین کمان[1] در کشور نامطلوب و نگران کننده است. افزایش تقاضای بچه ماهی قزل آلا در کشور و گسترش مراکز تولید در طی سال های اخیر و غیر استاندارد بودن اغلب مراکز تکثیر قزل آلا و نیز تکثیر غیر اصولی و غیر علمی در مزارع تکثیر بدون مجوز و همچنین تکثیر پیش مولدین بویژه مولدین نر زودرس باعث ایجاد اختلالات ژنتیکی و همخونی[2] در نسل مولدین و بروز صفات نامرغوب ناشی از آن شده است. بنابر وضعیت موجود و نتایج سوابق فعالیت های انجام شده، راهکار اساسی حل مشکلات و مسائل ژنتیکی تکثیر و پرورش ماهی قزل آلا در کشور، تدوین یک برنامه علمی بهگزینی و اصلاح نژاد مولدین بومی قزل آلا در سطح ملی و با استفاده از مشاورین داخلی و اساتید متخصص دانشگاهی و امکانات این مراکز می باشد.

در حال حاضردر اغلب موارد میزان موفقیت لقاح[3] به عنوان معیاری برای ارزیابی و طبقه بندی کیفیت تخم قلمداد می شود، ولی در واقع طبقه بندی کیفیت تخم توسط فاکتور های مختلفی از جمله کیفیت تخم ها قبل از لقاح، تعداد اسپرماتوزآ ها و سرعت حرکت اسپرم تعیین می شود(Kamler, 2005). علاوه بر این بیشتر

---

1 - *Oncorhynchus mykiss*
2 - Inbreeding
3 - Fertilization success

توجهات بخش آبزی پروری بر روی کیفیت تخمک متمرکز شده است و خصوصیات اسپرم کمتر مد نظر قرار می گیرد در حالی که هر دو این عوامل می توانند بر بقاء و زنده ماندن تخم و جنین تاثیر گذار باشند(Snook, 2005; Otteson & Babiak,2009).

امروزه در مراکز تکثیر، بسیاری از گونه های آزاد ماهیان به منظور حفاظت یا تولید، مورد تکثیر مصنوعی قرار می گیرند. در اغلب موارد در تکثیر مصنوعی از گامت ها به صورت لقاح مختلط[1] استفاده می کنند، به این صورت که تخمک های حاصل از چندین ماهی ماده را درون یک ظرف با اسپرم چند ماهی نر ترکیب می کنند(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 نیرومند ترین روش های بهگزینی جنسی[2] است، می شود(Birkhead and MØller, 1998; Snook, 2005). Campton (۲۰۰۴) دو مشکل اساسی حاصله در اثر استفاده از ترکیب اسپرم را به صورت مفصل شرح داده است. به طور خلاصه، رقابت اسپرم ایجاد شده در مراکز تکثیر می تواند سبب ایجاد تغییرات در موفقیت تولید مثلی جنس نر شده که این امر به نوبه خود منجر به افزایش ضریب همخونی[3] و در نتیجه از بین رفتن تنوع ژنتیکی در نتاج[4] مراکز تکثیر می شود و مشکل دیگر اینکه سبب تحریک انتخاب برخی از صفت های خاص در جمعیت شود. علاوه براین هنگام استفاده از اسپرم چندین ماهی نر، اثرات پدری بر روی مراحل اولیه زندگی تحت الشعاع قرار می گیرد (Rideout et al., 2004).

در حال حاضر با استفاده از PCR و نشانگرهای مولکولی از قبیل Microsatellites، RFLP و RAPD به بررسی و شناسایی ژنوتیپ گونه ها و جمعیت های مختلف می پردازند. از جمله مارکرهای مولکولی، ریزماهواره[5] ها هستند که با داشتن مزایایی چون چندشکلی بالا، سادگی و سرعت بالای تکثیر در PCR، طبیعت چند اللی، توارث همبارز، طول کوتاه، پوشش ژنومی وسیع، نسبت و فراوانی بالا، موجب شده که ریز ماهواره ها کاربری موفقیت آمیز با تنوع زیاد در رشته های مختلف تحقیقی و عملی داشته باشند. همچنین ریزماهواره ها در زمینه شیلات و آبزی پروری برای توصیف ذخایر ژنتیکی، انتخاب ذخایر مولدین، شناسایی ژن های کدگذاری کننده صفات مهم اقتصادی، برنامه های تولید مثلی، مطالعه ساختار جمعیتی، تفکیک نژادهای پرورشی از نژادهای وحشی، ارزیابی رابطه ژنتیکی والدین با فرزندان، مدیریت مولدین، تشخیص ماده زایی، پلی پلوئیدی، تشخیص

1 - Mixed-milt fertilization
2 - Sexual selection
3 - Inbreeding coefficient
4 - Offspring
5 - Microsattelite

دورگه ها و ارزیابی تکامل کارایی بالایی دارند (Chistiakov *et al.*, 2006). هدف از انجام این تحقیق بررسی تأثیرات رقابت اسپرم بر تنوع ژنتیکی نسل F1 می باشد.

۱-۱ مروري بر وضعيت آبزي پروري ايران

کشور ایران دارای توانایی بالقوه ای جهت توسعه فعالیت های شیلاتی و آبزی پروری است. حدود ۲۷۰۰ کیلومتر خط ساحلی در شمال و جنوب کشور و وجود صدها دریاچه، رودخانه و چشمه پتانسیل عظیمی را جهت گسترش فعالیت های آبزی پروری فراهم می کند. علیرغم منابع وسیع و با ارزش شیلاتی در ایران، سهم صنایع شیلاتی در کشور مطلوب نیست (۰/۲۳٪ از تولید ناخالص ملی[1] و ۲/۷٪ از بخش کشاورزی)(Hassanpour *et al.*, 2010). میزان تولید ماهی در ایران ۵۶۲۸۲۱ تن بوده که از این بین ۱۵۴۹۷۹ تن آن مربوط به آبزی پروری می باشد و بقیه آن صید از خلیج فارس، دریای عمان و دریای خزر است. بنابراین، نسبت صید و صیادی به آبزی پروری در ایران ۷۲/۵ به ۲۷/۵ می باشد که در مقایسه با سال ۲۰۰۶ بخش آبزی پروری رشد بیشتری داشته است(FAO, 2010).

با این وجود، به منظور تامین امنیت غذایی و تعدیل صید ماهی در کشور، اقدام به ترویج پرورش گونه های با ارزش شده است. تنها گونه پرورشی سردآبی در ایران قزل آلای رنگین کمان می باشد.

ماهی قزل آلای رنگین کمان یکی از مهمترین گونه های تجارتی آزاد ماهیان است که به طور گسترده در بسیاری از کشور های جهان پرورش داده می شود. سازمان خواروبار و کشاورزی سازمان ملل متحد، تولید جهانی این ماهی را ۵۷۶۲۸۹ تن برآورد کرده است که در بین گونه های پرورشی رتبه هفدهم را دارا ست. حدود ۱۰/۹٪ این میزان تولید مربوط به ایران می باشد. لذا ایران یکی از مهمترین کشور های تولیدکننده قزل آلا در جهان می باشد که در آسیا رتبه اول و در جهان رتبه سوم را بعد از نروژ و شیلی دارد. بطوری که میزان تولید ماهیان سردآبی (قزل آلا) در کشور از ۴۴۰ تن در سال ۱۳۶۸ به ۶۲۶۳۰ تن در سال ۱۳۸۷ بالغ شده است (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۷۹- ۱۳۸۷) (جدول ۱-۱).

جدول۱-۱- تولید ماهیان سردآبی در ایران از سال ۱۳۷۹ تا ۱۳۸۷ (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۷۹- ۱۳۸۷) ارقام (تن)

سال تولید	۱۳۷۹	۱۳۸۰	۱۳۸۱	۱۳۸۲	۱۳۸۳	۱۳۸۴	۱۳۸۵	۱۳۸۶	۱۳۸۷
میزان تولید(تن)	۹۰۰۰	۱۲۱۷۰	۱۶۰۲۶	۲۳۱۳۸	۳۰۰۰۰	۳۴۷۶۰	۴۶۲۷۵	۵۸۷۶۱	۶۲۶۳۰

1 - Gross domestic product

۱-۲ ماهي قزل آلاي رنگين كمان

منشأ قزل آلای رنگین کمان از منطقه آمریکای شمالی و اقیانوس آرام می باشد. این ماهی در سال ۱۸۸۰ به اروپا وارد گردید. قزل آلای رنگین کمان در آب های ساحلی در محدوده بین جنوب آلاسکا تا جنوب ارگان[1] و کالیفرنیا زیست می کند. این ماهی فرم های مختلفی دارد. نوع قاره ای که به دریا مهاجرت نمی کند به قزل آلای رنگین کمان و نوع دوم که مهاجرت می نماید به عنوان قزل آلای سر فولادی شناخته می شود. قزل آلای رنگین کمان نسبت به سایر گونه ها دارای رشد سریعتر، قدرت سازش پذیری بالاتر نسبت به غذای مصنوعی، مقاومت بیشتر در مقابل بیماری ها و حساسیت کمتر نسبت به شرایط محیطی مانند درجه حرارت، اکسیژن محلول و ... می باشد. قزل آلای رنگین کمان مناسبترین، راحتترین و جذابترین ماهی جهت افزایش تولید و تأمین گوشت سفید می باشد(وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۶). پراکنش این ماهی در ایران در حوزه دریای خزر، دجله و کارون، نمک، کویر، زاینده رود، تجن و کرمان می باشد. دارای ۶۳-۶۱ مهره، ۱۹ خار آبششی و ۴۸ زائده باب المعدی است. وجود دندان ومر، دندان بر روی آرواره بالا و پایین، خال های تیره بر روی باله دمی، فلس های کوچک و متوسط، طول کلی با ۱۷/۴ سانتی متر و وزن ۷۵ گرم از دیگر ویژگی های این ماهی می باشد(ستاری، ۱۳۸۲).

شكل ۱-۱ ماهي قزل آلاي رنگين كمان

[1] - Oregan

۱-۲-۱ رده بندی(ستاری، ۱۳۸۲):

Subphylum	Vertebrata
Super Class	Gnathostomata
Grade	Pisces
Class	Osteichthyes
Sub Class	Actinopterygi
Division	Haleocostomi
Sub Division	Teleostei
Order	Salmoniformes
Sub Order	Salmonoidei
Genus	*Oncorhynchus*
Species	*mykiss*

۱-۳ تعریف کیفیت اسپرم

توانایی اسپرم در بارور سازی موفق تخمک ها به عنوان معیار ارزیابی و تعریف کیفیت اسپرم مطرح است. هر پارامتر فیزیکی قابل اندازه گیری که به طور مستقیم در ارتباط با قدرت بارور سازی اسپرم باشد می تواند به عنوان معیاری برای اندازه گیری کیفیت اسپرم مورد استفاده قرار گیرد. در طی فرایند انتخاب طبیعی[1]، تعداد و خصوصیات اسپرم به سمتی گرایش پیدا می کند که شایستگی[2] فردی ماهی را در ارتباط با استراتژی های تولید مثلی خاص آن ماهی به حداکثر برساند. در شرایط طبیعی، ماهیان نر در رقابت با یکدیگر هستند و بر اساس استراتژی تولید مثلی و محیط فیزیکی خود عمل می کنندکه در ماهیان تلئوست به صورت تولید انواع اسپرم در حجم های مختلف نمود پیدا می کند(Taborsky, 1998). در برخی موارد، فرایند هایی از قبیل رقابت اسپرم[3]، ماهی را به سمتی پیش می برد که به منظور حصول اطمینان از بارورسازی، مقدار بیشتری اسپرم تولید کنند (Mjolnerod *et al*., 1998; Peterson and Warner, 1998). با این وجود، اطلاعات کافی در ارتباط با میزان کاهش کیفیت اسپرم قبل از عملیات لقاح در دسترس نیست. علاوه بر این اگر از مخلوط اسپرم چند ماهی

1 - Natural selection
2 - Fitness
3 - Sperm competition

استفاده شود، اختلافات موجود در کیفیت اسپرم ممکن است نقش مهمی در کاهش اندازه ظاهری جمعیت[1] و تنوع ژنتیکی داشته باشند و تعیین موقعیت نسبی ماهیان نر به طور جداگانه امری مشکل می باشد. لذا در حال حاضر یک تمایل خاص نسبت به اندازه گیری سایر پارامترها یا بیومارکرهای کیفیت اسپرم که مستقیماً در ارتباط با قدرت بارورسازی اسپرم است، وجود دارد. بیومارکرهای مربوط به کیفیت اسپرم که تاکنون ثبت شده اند شامل اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، اسمولالیته و pH پلاسمای منی ، ترکیب شیمیایی پلاسمای منی، فعالیت های آنزیمی، غلظتATP، تحرک، ریخت شناسی و فراساختار[2]، قدرت بارورسازی و چند مورد دیگر می باشند (Billard and Cosson, 1992; Billard *et al*., 1995a; Ciereszko and Dabrowski, 1993, 1994; Lahnsteiner *et al*., 1996a, 1998; Fauvel *et al*., 1998; Geffen and Evans, 2000; Chowdhury and Joy, 2001). از آنجا که مطالعات صورت گرفته در خصوص توصیف ویژگی های اسپرم (که می توانند بارورسازی را تحت تأثیر قرار دهند)، اختلافات فردی زیادی را نشان داده اند(Dreanno *et al*., 1998)، لذا این مسأله، استفاده از یک خصوصیت ویژه اسپرم را برای تعریف کیفیت اسپرم دچار مشکل کرده است. برخی مطالعات نشان می دهند که اسپرم های بدون تحرک می توانند سبب لقاح تخمک شوند(Truscott and Idler, 1969). تمام این مثال ها محدودیت استفاده از یک خصوصیت را برای تعیین کیفیت اسپرم تأیید می کند. البته برخی از این پارامترها را نسبتاً می توان به راحتی اندازه گیری و مورد استفاده قرار داد (اسپرماتوکریت، قابلیت حیاتی و تحرک)، درحالی که بقیه پارمترها نیاز به آنالیز های آزمایشگاهی پیچیده (آنالیز های بیوشیمیایی)، یا تجهیزات گران قیمت (برای اندازه گیری تحرک کمی و واقعی) یا قابلیت دسترسی تخمک ها(موفقیت لقاح) دارند.

۱-۴ خصوصیات منحصر به فرد اسپرم ماهیان

۱-۴-۱ فعال سازی تحرک

از آنجا که اسپرم ماهیان در پلاسمای منی غیر فعال می باشد (Ciereszko *et al*., 2000) ، لذا باید جهت فعال سازی از محلول های فعال کننده[3] استفاده شود. محلول های فعال کننده حاوی نمک ها (ترکیبات یونی و غیریونی) هستند که به شدت فشار اسمزی مایع اطراف اسپرماتوزوآ را تحت تاثیر قرار می دهند. این تغییر در فشار اسمزی نسبت به پلاسمای منی در ماهیان دریایی در جهت افزایش و در ماهیان آب شیرین کاهش رخ می دهد، بدین معنی که فشار اسمزی محلول فعال کننده نسبت به مایع سمینال در ماهیان دریایی بیشتر و در ماهیان آب

1 - Apparent population size
2 - Ultrastructure
3- Activating solution

شیرین کمتر است. در برخی موارد فشار اسمزی به تنهایی تاثیر گذار نمی باشد و باید غلظت یون های خاصی تنظیم شوند. مثالی در این زمینه غلظت یون پتاسیم می باشد که در برخی گونه ها از جمله آزادماهیان، ماهیان خاویاری و پاروپایان باید کاهش زیادی داشته باشد، در حالی که در سایر ماهیان از جمله ماهیان پهن و توربوت غلظت CO_2 است که باید تا حد زیادی کاهش یابد (Alavi et al., 2008).

۱-۴-۲ مدت زمان تحرک[1]

کوتاه بودن مدت زمان تحرک اسپرم (Kime *et al.*, 2001) که در اغلب ماهیان تلئوست مشخص شده است (برای مثال در آزاد ماهیان کمتر از ۳۰ ثانیه) نقش اساسی در موفقیت لقاح دارد زیرا اسپروماتوزوآ باید در طول این دوره کوتاه سوراخ میکروپیل را پیدا و وارد آن شود. در ماهیانی مانند آزاد ماهیان که دارای تخم های درشت (قطر حدود۵ میلیمتر) هستند با توجه به مدت زمان تحرک اسپرم (کمتر از ۳۰ ثانیه) اسپرماتوزآ تنها می تواند کمتر از نصف مسیر اطراف تخمک (۳تا۴/۹میلی متر)را طی کند (Perchec *et al.*, 1993). در روند تکامل، انواعی از استراتژی های آمیزش انتخاب شده است که در آنها حداکثر شانس تماس اسپرم با تخمک وجود داشته باشند، به طوری که گامت های هر دو جنس در نزدیکترین فاصله به هم رها می شوند. با این وجود واضح است که هر چه اسپرم دارای تحرک بیشتری باشد شانس بارورسازی بیشتری را دارد. در اغلب گونه های پرورشی مدت زمان تحرک کوتاه است (حدود یک دقیقه) و تنها با استفاده از روش های سریع و حساس می توان ارزیابی صحیحی از خصوصیات تحرک داشت. لذا باید از هرگونه فعال سازی اسپرم قبل از لقاح جلوگیری شود، در غیر اینصورت حتی در صورت خوب بودن قدرت تحرک اولیه، در حین بررسی این اسپرم ها در گروه اسپرم های غیر متحرک طبقه بندی می شوند. از سوی دیگر به منظور دستیابی و تعیین بهترین دوره زمانی تحرک اسپرم، مشاهدات میکروسکوپی باید خیلی سریع صورت گیرد. از آنجا که این دوره زمانی ممکن است تنها چند ثانیه بعد از فعال سازی طول بکشد، باید ارزیابی اسپرم مستقیما در زیر میکروسکوپ بر روی لام صورت گیرد و همچنین وقایع این دوره کوتاه ضبط شود(Cosson *et al.*, 1997).

۱-۴-۳ ریخت شناسي و فرا ساختار اسپرماتوزوآ

معمولا قطر قسمت سر اسپرم ماهیان ۳ تا ۴ میکرومتر است (اغلب کروی شکل) که امکان مشاهده راحت آن را با بزرگنمایی کم فراهم می کند. در مقابل، قطر قسمت میانی اسپرم معمولا حدود ۱ میکرومتر می باشدکه در هنگام تحرک شدید، مشاهده آن را حتی در صورت استفاده از بزرگنمایی ۴۰ یا ۶۰ سخت و یا غیر ممکن می سازد. لذا جهت مشاهده حرکات دم نیاز به دو تکنیک ضروری به نظر می رسد: اول، استفاده از یک زمینه

1 - Period of motility

تاریک میکروسکوپی و دوم استفاده از تصویر برداری استروسکوبی به منظور تهیه تصاویر خیلی سریع از دم در حال حرکت، زیرا با استفاده از این تکنیک تصاویر دم بدون حرکت به نظر می رسند(Alavi et al., 2008).

یکی از ویژگی های اسپرم ماهیان تلئوست، فقدان آکروزوم می باشد که متفاوت با اسپرم پستانداران است، اگرچه در تاس ماهی شکلان یک آکروزوم فعال دیده می شود (Linhart and Kudo, 1997). گونه های مختلف ماهیان از لحاظ شکل سر و هسته اسپرم تفاوت زیادی با هم دارند (Billard and Cosson, 1992; Billard *et al*., 1982) و قسمت میانی حاوی تعداد کمی میتوکندری است که در برخی گونه ها بخوبی تکامل یافته است (گوپی) و یا تحلیل رفته است (آزاد ماهیان و کپور ماهیان) (Billard *et al*., 1995a). در برخی از ماهیان دارای لقاح داخلی مانند Ocean pout اسپروماتوزوآ دارای ۲ تاژک می باشد (Mattei, 1988; Yao *et al*., 1995) در حالی که به طور کلی اسپرم ماهیان با شیوه لقاح خارجی دارای یک تاژک ساده هستند، اگر چه در گربه ماهی کانالی[1] گزارشاتی مبنی بر وجود اسپرم های دارای ۲ تاژک ارائه شده است (Jaspers *et al*., 1976).

۱-۴-۴ پارامتر های تحرک اسپرم در طول دوره تحرک اسپرم کاهش می یابند

مقادیر تمام خصوصیت های تحرک اسپرم به سرعت بعد از فعال سازی تحرک اسپرم کاهش پیدا می کنند(Cosson *et al*., 1999; Cosson, 2004). این قانون کلی با وجود برخی تغییرات در اغلب گونه های ماهیان صادق بوده اما در اغلب موارد توقف حرکت در مدت زمان کوتاهی صورت می گیرد. این بدین معنی است که در هنگام مقایسه خصوصیات اسپرم درون گونه ای[2] یا بین گونه ای[3] باید دقیقا به نقطه زمانی اندازه گیری پارامتر اشاره شود (Cosson *et al*., 1997, 1999; Cosoon, 2004).

۱-۴-۵ یکنواختی حرکت[4]

اگر در یک نقطه زمانی معین بعد از فعال سازی تحرک، اسپرم ها مشاهده شوند بخش اعظمی (بالای ۹۰ در صد) از آنها بسیار شبیه به هم به نظر می رسند. این خصوصیت سبب شده که آنالیز حرکت بسیار راحت تر از اسپرم سایر جانوران باشد (Cosson *et al*., 1997, 1999).

---

1 - *Ictalurus punctatus*
2 - Intra-species
3 - Inter-species
4 - Homogeneity of movement

۱-۴-۶ سرعت اولیه بالا و فراوانی ضربات شلاق مانند[1]

با توجه به دو نکته قبلی (۱-۴-۴ و ۱-۴-۵)، مشکلی که باید با آن دست و پنجه نرم کرد، سرعت اولیه بالای اسپرم ماهیان (بالای ۳۰۰μm/s) می باشد (۲ تا ۳ ثانیه بعد از شروع حرکت) که حاصل ضربات شلاق مانند زیاد آنها است. این دو فاکتور در ارزیابی کمی اسپرم مهم هستند زیرا این خصوصیات در دوره ای از فعالیت اسپرم رخ می دهند که در نزدیکی و نهایتاً رسیدن اسپرم به سطح تخمک بسیار تاثیر گذارند. در مقابل، دسترسی به این بازه زمانی از لحاظ تکنیکی، به دلایلی ازجمله این که این دوره زمانی فوراً بعد از فعال سازی اسپرم می باشد و همچنین سرعت خیلی سریع اسپرم ها امکان تمرکز بر روی آنها را کوتاه تر می نماید بسیار مشکل می باشد (Cosson *et al*., 1997, 1999).

۱-۴-۷ اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم

تراکم اسپرماتوزوآ در پلاسمای منی گونه های مختلف ماهیان بسیار متغیر است. به عنوان مثال تراکم اسپرم در کپور $۱۰^{۹} \times ۵ - ۱$، در باس دریایی $۱۰^{۹} \times ۵۰$، در آزادماهیان $۱۰^{۹} \times ۱۵ - ۵$ و در ماهیان خاویاری $۱۰^{۹} \times ۴ - ۰/۱$ بدست آمده است. بنابراین تراکم چنان زیاد است که بدون رقیق سازی منی در محلول رقیق کننده، تشخیص انفرادی سلول ها بسیار مشکل می باشد. در عوض تراکم بالا امکان رقیق سازی بیشتر را در محلول فعال کننده فراهم می سازدکه منجر به دقت بیشتر در مشاهدات تحرک انفرادی سلول ها می شود. روش مناسب جهت مقابله با مشکل تراکم بالا استفاده از روش دو مرحله ای است(Billard and Cosoon, 1989). بطوری که در ابتدا اسپرم در یک محلول غیر فعال کننده رقیق شده (رقت۵۰ : ۱ برای شروع خوب است) و سپس اسپرم رقیق شده دوباره در محلول فعال کننده بر روی لام رقیق می شود.

در گذشته تراکم اسپرم در پلاسمای منی به منظور ارزیابی کیفیت اسپرم مورد استفاده قرار می گرفت. روش استاندارد تعیین تراکم اسپرم (تعداد سلول) در ماهیان شمارش اسپرماتوزآها با استفاده از لام هماسیتومتر و یا یک چمبر شمارشی مشابه می باشد (Buyukhatipoglu and Holtz, 1984). از آنجا که این روش وقت گیر است، لذا دو روش دیگر یعنی سانتریفیوژ به منظور تعیین میزان اسپرماتوکریت (درصد نسبت حجم مواد متراکم سفید به حجم کل منی) و اسپکتروفتومتری نیز برای تعیین تراکم نوری، به منظور تعیین سریع تراکم اسپرم مورد استفاده قرار می گیرند. از آنجا که اندازه گیری اسپرماتوکریت و تراکم اپتیکال آسان می باشد لذا انتخاب نوع روش

---

1 - Beat frequency

معمولاً بر اساس دسترسی به تجهیزات صورت می گیرد، اما نوع دستگاه[1] مورد استفاده برای شمارش ممکن است بر روی نتایج بدست آمده تأثیر گذار باشد.

در ماهی قزل آلای رنگین کمان (Buyukhatipoglu and Holtz, 1984) و کپورمعمولی[2] (Christ *et al*., 1996; Lubzens *et al*., 1997) با نزدیک شدن به انتهای فصل تولید غلظت اسپرماتوزآ کاهش پیدا می کند.

۱-۴-۸ ترکیبات پلاسمای منی[3]

مطالعات مختلفی در خصوص ترکیب منی ماهیان تلئوست صورت گرفته است(Piironen and Hyva¨rinen, 1983; Billard and Menezo, 1984; Linhart *et al*., 1991). در دهه های اخیر ترکیب مایع سمینال و پروفایل آنزیمی اسپرم مورد توجه خاصی قرار گرفته است که بیشتر مطالعات در آزاد ماهیان و کپور ماهیان صورت گرفته است. آنالیز پلاسما شامل اجزای غیر آلی (K^+، Na^+، Ca^{+2}، Mg^{+2}) که در فرآیند جلوگیری و فعال سازی تحرک اسپرم دخیل هستند (Morisawa, 1985; Morisawa *et a*l., 1983a,b,c) ، ترکیبات آلی که در متابولیسم انرژی نقش داشته (تری گلیسریدها، اسیدهای چرب گلیسرول،گلوکز، لاکتات) (Lahnsteiner *et al*., 1993) و چندین آنزیم (اسید فسفاتاز، آلکالین فسفاتاز، پروتئاز، مالات دهیدروژناز، آدنوزین تریپوفاتاز، آسپارتات، آمینوترانسفراز)می باشد (Lahnsteiner et al., 1996c; Babiak *et a*l., 2001). مهمترین سوبستراها و متابولیت های مسیر های متابولیک اسپرماتوزوآ که مورد مطالعه قرار گرفته اند شامل ATP، ADP،AMP، NADH، چربی ها، اسید های چرب، گلوکز، لاکتات، پیروات، سرتین، فسفاتاز هستند (Lahnsteiner *et al*., 1998). خصوصیات کلی اسپرم که در بالا توضیح داده شد به عنوان یک دیدگاه کلی از کیفیت اسپرم مطرح است ولی در توصیف پتانسیل سلول های اسپرم در موفقیت لقاح دچار اشکال می باشد. با توجه به هتروزیگوتی آشکار در سلول های اسپرم، ایده توسعه آنالیز اسپرم به منظور در نظر گرفتن پارامترهای سلول های اسپرو ماتوزآ به صورت جداگانه مطرح است.

۱-۴-۹ قابلیت زیست[4] و انسجام غشاء[5]

اگر چه قابلیت زیست واقعی اسپرماتوزوآ به معنی توانایی حرکت و بارورسازی آنها می باشد با این حال در مطالعات از کیت های رنگ آمیزی حیاتی[6] جهت رنگ آمیزی اسپرم استفاده می شود. در این مورد، قابلیت زیست به طور واقعی تنها به قابلیت زیست و یا انسجام غشاء سلول های اسپرم بر می گردد . این گونه تست ها بر

---

1. Apparatus
2 - *Cyprinus carpio*
3 - Constituents of the seminal plasma
4 - Sperm viability
5 - Membrance integrity
6 - Live/dead sperm viability Kits

اساس تکنیک های لکه گذاری دو گانه[1] با استفاده از رنگ های فلورسنت، تکنیک های فلوسیتومتری و مشاهده در زیر یک میکروسکوپ هم کانون صورت می گیرد. بهترین کاربرد این نوع اندازه گیری ها، نشان دادن انسجام غشاء سلول است تا این که بیانگر قابلیت زیست واقعی باشد زیرا سلول های دارای غشاء سالم نیز ممکن است به دلیل تأثیر سایر فاکتورها، قابلیت زیست محدودی داشته باشند.

۱- ۴- ۱۰ توانایی بارورسازی[2]

از آنجا که ممکن است کیفیت تخمک متغیر باشد و بر قدرت باروری تأثیر گذار باشد لذا استفاده از قدرت بارورسازی اسپرم به عنوان معیار اندازه گیری غیر مستقیم کیفیت اسپرم قابل اطمینان نیست. در برخی گونه ها دسترسی همزمان تخمک و اسپرم، طول مدت زمان اجرای مطالعه تعیین کیفیت را محدود می کند. فاکتورهای دیگری از جمله تعداد اسپرم به ازای تخمک، مدت زمان تماس میان گامت ها و یا روش بکار گرفته شده لقاح نیز ممکن است بر موفقیت لقاح تأثیر گذار باشند (Suquet *et al*., 1995; Chereguini *et al*., 1999). یکی از مهمترین کاربرد های آزمون های ارزیابی لقاح، کنترل کردن دقت و اعتبار سایر روش های اندازه گیری کیفیت اسپرم می باشد. در برخی مراحل، اعتبار سایر اندازه گیری های کیفیت اسپرم باید از طریق لقاح موفق تخم ها مشخص شود حتی اگر چنین کاری مدت زمان زیادی نیاز داشته باشد.

۱-۵ پارامتر های منحصر به فرد سلول های اسپرم

روش هایی از جمله شمارش اسپرماتوزوآ امکان تخمین تعداد کل سلول های اسپرم را بدون در نظر گرفتن وضعیت انفرادی سلول ها فراهم می سازد. این مسأله ممکن است پیامدهایی را در پی داشته باشد. هنگامی که از ترکیب اسپرم چند ماهی استفاده می شود از آنجا که اسپرم هایی که در نهایت موجب بارورسازی تخمک می شوند ممکن است دارای مزیت رقابت پذیری نسبت به دیگر اسپرم ها باشند، بنابراین تکنیک هایی که بر روی خصوصیات فردی سلول های اسپرم از جمله تحرک و ریخت شناسی متمرکز شده اند نسبت به اندازه گیری کلی خصوصیات منی نتایج بهتری ارائه می دهند.

---

1 - Dual-staining protocols
2 - Fertilizing capacity

۱-۶ رقـابـت اسپـرم

رقابت اسپرم زمانی رخ می دهد که اسپرم دو یا چند نر جهت بارورسازی توده ای از تخمک ها با هم رقابت کنند(Hildemann & Wagner, 1954; Parker, 1970). رقابت اسپرم پدیده ای شایع می باشد و در انواع جانوران از جمله دوزیستان، پرندگان، ماهی ها، حشرات و پستانداران رخ می دهد (Birkhead & MØller, 1998). رقابت اسپرم می تواند منجر به ایجاد محدوده گسترده ای از سازگاری های رفتاری، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی شود که سبب افزایش موفقیت اسپرم نسبت به رقبا شود (Parker, 1970; Smith, 1984). امروزه به خوبی مشخص شده است که افراد نر از لحاظ قدرت رقابت پذیری[1] در طی لقاح متفاوت هستند (Gage *et al*., 1995; Arnqvist & Danielsson, 1999). با این حال، شناخت مکانیسم هایی که افراد نر در طی رقابت اسپرم استفاده می کنند تا احتمال موفقیت بارورسازی را افزایش دهند، در ابتدای راه است (نمونه هایی از این مطالعات شامل: Birkhead *et al*., 1999; Evans *et al*., 2003; Gage & Morrow, 2003; Garcı´a-Gonza´lez & Simmons, 2005). این شیوه انتخاب جنسی که پس از آمیزش صورت می گیرد به عنوان یک عامل مهم و متداول در تکامل بیولوژی تولید مثلی جنس نر و همچنین به عنوان یک عامل کلیدی تعیین کننده در موفقیت تولید مثلی متمایز ماهیان نر می باشد. با این وجود، علیرغم اهمیت این موضوع، جزئیات مکانیسم های دخیل در رقابت اسپرم در سطح گامت خیلی کم شناخته شده است (Gage *et al*., 2004).

در ماهی های دارای شیوه لقاح خارجی، رقابت اسپرم از حالت تقریبا به طور کامل انحصاری[2] تا تخمریزی در دسته های عظیم متغیر است (Stockley *et al*., 1997). Tabrosky (۱۹۹۸) فرض گذاشت که موفقیت در رقابت اسپرم به طور مستقیم به صرف انرژی جنس نر بر روی گامت ها و منی دارد. به بیان دقیق تر، در طول تخمریزی، چهار عامل که قادرند بر لقاح تاثیر گذارند شامل موارد زیر می باشد:

نزدیکی نرها به تخمک ها در زمان رهاسازی اسپرم:

نزدیکی نرها به ماده ها در طی رقابت اسپرم از آن جهت مهم است که در مسابقه لقاح تخمک ها، اسپرم هایی که نزدیکتر به ماده ها رها می شوند به عنوان یک مزیت رقابتی مطرح است. علاوه بر این، ممکن است تخمک ها و اسپرم ها، بویژه در آب های دارای جریان یا متلاطم به سرعت پراکنده شوند (Petersen & Warner, 1998; Petersen *et al*., 2001). امروزه ثابت شده است که هر چه نرها در زمان تخمریزی، به جنس ماده نزدیکتر باشند احتمال بارورسازی در رقابت اسپرم افزایش می یابد. مثال های از این جمله شامل قزل آلای قهوه ای[3] (

---

1 - Competitiveness
2 Near complete mate monopolization
3 - *Salvelinus fontinalis*

Blanchfield et al., 2003)، ماهی کاد اطلس[1] (Hutchings et al., 1999) و ماهی آزاد کوهو[2] (Schröder, 1973) می باشد.

زمان خارج شدن اسپرم و همزمانی آن با خروج تخمک ها

زمان اسپرم ریزی از آنجا مهم است که در صورت همزمانی با خارج شدن تخمک می تواند منجر به افزایش احتمال تماس اسپرم با تخمک شود و همچنین مایع تخمدانی سبب تغییر رفتار اسپرم شده که در نهایت بر نتیجه رقابت اسپرم تاثیر می گذارد.. اگر اسپرم ریزی خیلی زود صورت گیرد، اسپرم پراکنده شده و بسیار رقیق می گردد(Levitan, 1998; Petersen & Warner, 1998; Petersen *et al*., 2001)، می میرد و یا در زمان تخمریزی ماهی ماده، حرکت رو به جلوی اسپرم ها تحلیل می رود. اگر اسپرم ریزی خیلی دیر انجام شود ممکن است تخمک ها بارور شده باشند. Hoysak و Liley (۲۰۰۱) به این نتیجه رسیدند که در ماهی آزاد ساک آی[3] محدوده زمانی مورد نیاز جهت بارورسازی تخمک ها بسیار محدود است و در نتیجه مجاورت جنس نر به ماده و همچنین زمان اسپرم ریزی از اهمیت ویژه ای در تعیین موفقیت در رقابت اسپرم برخوردار هستند. در ماهی چار قطبی[4]، حضور مایع تخمدانی سبب افزایش طول عمر، سرعت حرکت و سرعت خطی حرکت اسپرم می شود، حتی با این نکته که ویسکوزیته مایع تخمدانی خیلی بیشتر از آب شیرین است (Turner & Montgomerie, 2002). کاتیون هایی از جمله Mg^{2+} و Na^{+} موجود در مایع تخمدانی باعث افزایش تحرک و طول عمر اسپرم می شوند (برای مثال Linhart et al., 2002; Alavi et al., 2004).

تعداد اسپرم های رها سازی شده

تعداد اسپرم زمانی در موفقیت بارورسازی مهم می باشد که رقابت اسپرم از یک فرایند بخت آزمایی[5] پیروی کند. در بخت آزمایی، قدرت بارورسازی هر ماهی نر در ارتباط با تعداد اسپرم هایی است که در رقابت شرکت دارند (Parker, 1990). برای مثال، در ماهی آبشش آبی[6]، آزمون های 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، میزان مشارکت[7] آن ماهی در تولید نتاج نیز افزایش داشت(Neff *et al*., 2003). با این حال، در مطالعه ای دیگر بر روی ماهی آزاد

1 - *Gadus morhua*
2- *Oncorhynchus kisutch*
3- *Oncorhynchus nerka*
4 - *Salvelinus alpinus*
5 - Raffle-like process
6 - *Lepomis macrochirus*
7- Paternity

اطلس[1] هیچ گونه ارتباطی میان تعداد اسپرم و میزان مشارکت در تولید نتاج مشاهده نشد (Gage *et al*., 2004).

خصوصیات اسپرم از جمله سرعت حرکت

خصوصیات اسپرم از جمله سرعت حرکت می تواند در حین رقابت اسپرم مهم باشد (رجوع شود به Snook, 2005). اسپرم های سریعتر قادرند زودتر به تخمک ها رسیده و در نتیجه موفقیت رقابت با سایر اسپرم ها بیشتر می شود. برای مثال ، در ماهی آزاد اطلس پس از اجرای یک آزمایش رقابتی میان دو نر، نر هایی با اسپرم های سریعتر، نسبت بیشتری از تخمک ها را بارور ساختند و حدود نیمی از تغییرات موفقیت لقاح مربوط به سرعت نسبی حرکت اسپرم بود (Gage *et al*., 2004). سرعت اسپرم خصوصا زمانی می تواند مهم باشد که اسپرم قادر باشد به سوی تخمک ها حرکت کند (برای مثال Turner & Montgomerie, 2002).

۱-۷ نشانگرهای DNA[2]

نشانگرهای مولکولی به میزان زیاد و در هر موجود زنده ای مورد استفاده قرار می گیرد. اگرچه پتانسیل نشانگرهای مولکولی برای متخصصان اصلاح نژاد از حدود ۷۵ سال پیش شناخته شده بود، ولی کاربرد آنها تا حدود ۳۰ سال پیش به دلیل نبود نشانگرهای مناسب بسیار محدود بوده است. گسترش نشانگرهای DNA موجب بکارگیری روش های بسیاری برای غلبه بر مشکلات اصلاحی و ژنتیکی موجودات شده است.

کشف انواع مختلف آنزیم های محدودگر[3] توسط اسمیت و ویلکوکس[4] (۱۹۷۰)، همچنین کشف واکنش زنجیره ای پلیمراز[5] (PCR) توسط مولیس و فالونا[6] (۱۹۸۷) فرصت مناسبی برای بررسی تنوع و تفاوت موجودات موجودات مختلف در سطح DNA را امکان پذیر کرده است. توسعه نشانگرهای مولکولی DNA عصر جدیدی را در علم ژنتیک گشوده است، به طوری که به کمک این نشانگرها ایجاد نقشه های فیزیکی و ژنتیکی در موجودات زنده و همچنین شناسایی ژن های کنترل کننده صفات کیفی و کمی امکان پذیر شده است.

تا کنون تعداد زیادی از نشانگرهای DNA معرفی شده اند و در تجزیه های ژنتیک موجودات مورد استفاده قرار گرفته اند، این نشانگرها از نظر بسیاری از ویژگی ها مانند میزان چند شکلی، غالب یا همبارز بودن، تعداد جایگاه های تشخیص داده شده در هر آزمایش، توزیع در سطح کروموزوم، تکرارپذیری، نیاز یا عدم نیاز به توالی یابی DNA الگو و هزینه های مورد نیاز با همدیگر متفاوتند. انتخاب بهترین نشانگر به هدف مطالعه

---

1 - *Salmo salar*
2 - DNA markers
3 - Restriction enzyme
4 - Smith and Wilkocz
5 - Polymerase chain reaction
6 - Mullis and Faloona

(انگشت نگاری[1] ، تهیه نقشه های پیوستگی[2]، ژنتیک جمعیت و روابط تکاملی) و سطح پلوئیدی موجود مورد مطالعه بستگی دارد.

بدون تردید، ابداع و معرفی واکنش زنجیره ای پلیمراز یا PCR بیشترین نقش را در توسعه و تکامل نشانگرهای DNA داشته است. PCR، یک روش سریع تکثیر آزمایشگاهی قطعه یا قطعه های مورد نظر DNA است. به دلیل اهمیت و نقش موثر DNA نشانگرهای DNA را به دو دسته کلی نشانگرهای DNA مبتنی بر کاربرد واکنش زنجیره ای پلیمراز و نشانگرهای DNA غیر مبتنی بر کاربرد این روش طبقه بندی می کنند.

نشانگرهای DNA گروه بزرگی از نشانگرها را تشکیل می دهند. این نشانگرها سیر تحول و تکامل خود را به پایان نرسانیده اند و ابداع و معرفی روش های متنوع و جدیدتر ثبت ومشاهده تفاوت های ژنتیک بین موجودات از طریق مطالعه مستقیم تفاوت های موجود در بین ردیف های DNA آنها همچنان ادامه دارد(نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

از جمله نشانگرهای مولکولی، ریزماهواره ها هستند که با داشتن مزایایی چون چندشکلی بالا، سادگی و سرعت بالای تکثیر در PCR، طبیعت چند اللی، توارث همبارز، طول کوتاه، پوشش ژنومی وسیع، نسبت و فراوانی بالا، موجب شده که ریز ماهواره ها کاربری موفق با تنوع زیاد در رشته های مختلف تحقیقی و عملی داشته باشند(Chistiakov *et al*., 2006). همچنین ریزماهواره ها در زمینه شیلات و آبزی پروری برای توصیف ذخایر ژنتیکی، انتخاب ذخایر مولدین، شناسایی ژن های کدگذاری کننده صفات مهم اقتصادی، برنامه های تولید مثلی، مطالعه ساختار جمعیتی، تفکیک نژاد های پرورشی از طبیعی، ارزیابی رابطه ژنتیکی والدین با فرزندان، مدیریت مولدین، تشخیص ژینوژنز، پلی پلوئیدی، تشخیص دورگه ها و ارزیابی تکامل کارایی بالایی دارند (Chistiakov *et al*., 2006).

۱-۸ ریزماهواره ها

1- Fingerprinting
2 - Linkage map

ریزماهواره ها شامل واحد های تکی، دوتایی،...الی شش تایی تکرار شونده اند که در ژنوم بیشتر یوکاریوت ها پراکنده اند. به طوری که در هر ۱۰کیلو جفت باز از ردیف DNA دست کم یک ردیف ریزماهواره ای دیده می شود. ریزماهواره ها به سه گروه عمده تکرار های کامل، تکرار های ناکامل(معمولا توسط بازهای غیر تکرار شونده قطع می شوند) و تکرارهای مرکب (دو یا تعداد بیشتری از واحد های تکراری مجاور یکدیگر) تقسیم می شوند. تعداد تکرار در هر واحد بسیار متفاوت است. حداقل تعداد واحدهای تکرار شونده برای ریزماهواره های دو نوکلئوتیدی وسه نوکلئوتیدی به ترتیب ده و هفت بار تکرار تعیین شده است.

ریزماهواره ها یا ردیف های تکراری ساده (SSR) گروهی از ردیف های تکرار شونده اند که با نام های مختلف همچون تفاوت طول ردیف های ساده[۱] (SSLPs)، ردیف های کوتاه تکراری[۲] (STRs)، موتیف های با ردیف ساده[۳] (SSMs)، و نقاط ریزماهواره نشانمند از ردیف[۴] (STMs) نیز خوانده می شوند. اصطلاح ریزماهواره ابتدا توسط لیت ولوتی[۵] در سال۱۹۸۹ به کار برده شد. ردیف های ریزماهواره ای غیر پایدارند و با کاهش یا افزایش واحد های تکرار شونده دچار تغییرات فراوان در طول می شوند. ریزماهواره ها نخستین بار در ژنتیک انسانی برای تشخیص برخی از بیماری هایی که با تغییر تعداد واحد های تکرار شونده ریزماهواره ها همراه بودند، استفاده شدند. تنوع در تعداد تکرار ریزماهواره ها که به کمک PCR و الکتروفورز قابل آشکار سازی اند، موجب شده است که ریزماهواره ها به عنوان ابزار مولکولی با پتانسیل بسیار زیاد برای تشخیص های ژنومی در آزمایشگاه ها استفاده شود.

فراوانی ردیف های کوتاه تکرارشونده در ژنوم ارگانیسم های مختلف، اعم از یوکاریوت ها و تا حدی پروکاریوت ها به اثبات رسیده است. تعدادباز موجود در هر ردیف تکرار شونده ممکن است دو، سه، چهار یا حتی بیشتر باشد. طول ریزماهواره ها معمولا کمتر از ۱۰۰ جفت باز بوده و توسط دو ردیف منحصر به فرد در دو طرف محدود شده اند.

ریزماهواره ها با روش های پیچیده زیست شناسی مولکولی و با هزینه زیاد شناسایی و ردیف های مجاور آنها تعیین می شوند. سپس بر اساس ردیف های احاطه کننده ریزماهواره آغازگر[۶] طراحی و ساخته می شود. از طریق واکنش زنجیره ای پلیمراز و با استفاده از این گونه آغازگرها می توان DNA ژنومی را برای تکثیر ریزماهواره

1 - Simple sequence length polymorphisms
2 - Short tandem repets
3 - Simple sequence motifs
4 - Sequence tagged microsatellite sites
5 - Litt and Luty
6 - Primer

های مذکور مورد استفاده قرار داد. فرآورده های واکنش زنجیره ای پلیمراز بر روی ژل های واسرشته ساز پلی اکریلامید که تفاوت هایی حتی به اندازه چند جفت باز را نمایان می سازند، از همدیگر مجزا می شوند. آزمایش های مکرر نشان داده اند که تفاوت و تنوع ناشی از ریزماهواره ها در ارگانیسم های مختلف به ویژه در یوکاریوت ها بسیار زیاد است.

۱-۸-۱ مزایای ریزماهواره ها

الف- کاربرد آنها وتفسیر نتایج نسبتا ساده است؛

ب - سیستم چند آللی(تا۱۱آلل) از ویژگی های بارز این نوع نشانگر است؛

ج - بسیار متنوع هستند؛

د - به وفور در ژنوم یوکاریوت ها یافت می شوند؛

ه - بیشتر ریزماهواره ها غیرعملکردی [1] هستند؛

و - همبارز هستند.

۱-۸-۲ معایب ریزماهواره ها

الف- شناسایی ریزماهواره ها، تعیین ردیف بازی آنها، طراحی و ساخت آغازگرها و تهیه نقشه ژنتیک ریزماهواره ها که مقدمه کاربرد این نشانگرهاست، بسیار پیچیده و مستلزم صرف وقت وهزینه بسیار زیاد است؛

ب- در صورت توزیع نامناسب ریزماهواره ها در طول ژنوم کاربرد موثر آنها در مکان یابی ژنها محدود می گردد؛

ج- تنوع بیش از حد ریزماهواره ها، کاربرد آنها را در رده بندی و تعین قرابت مورد سئوال قرار داده است. به نظر می رسد استفاده از ریزماهواره ها به همین دلیل فقط به شناسایی ارقام و رده بندی گونه ها محدود خواهد شد و در تعیین قرابت بین گونه های دورتر کاربردی نخواهد داشت. البته در صورت شناسایی و تعیین جایگاه ژنی تعداد بیشتری ازآنها، می توان از این نوع نشانگرها برای انگشت نگاری ارقام وبه ویژه در امور حقوقی مربوط به به تشخیص ارقام وغیره استفاده کرد؛

د- کمبود تعداد ریزماهواره های شناخته شده در برخی از موجودات استفاده از آنها را در مکان یابی ژنها محدود کرده است.

ریزماهواره ها با توجه به سیستم چند آللی و چند شکلی بسیار زیادی که دارند از نشانگر های امید بخش برای آینده محسوب می شوند. گرچه شناسایی و تعیین ردیف بازی آنها پیچیده وپرهزینه است ولی به مرور زمان وبا

---

1 - Nonfunctional

تلاش و همکاری آزمایشگاه های مختلف در گوشه وکنار جهان و به ویژه با پیشرفت طرح عظیم تعیین ردیف بازی ژنوم های موجودات که در کشور های مختلف در حال اجرا است، دیر یا زود تعداد زیادی از ریزماهواره ها شناسایی و جایگاه ژنی آنها تعیین خواهد شد. به نظر می رسد ریزماهواره ها از گزینه های مناسب برای نشانمند نمودن ژن ها[1] و انتخاب به کمک نشانگر ها باشند. اگرچه تردید هایی برای استفاده از این نشانگر در رده بندی و مطالعات فیلوژنیک بویژه در سطوح بالاتر از گونه وجود دارد که احتمال استفاده از آنها را در این قبیل مطالعات ضعیف می کند (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶)

۱-۹- مروري بر مطالعات انجام شده

در مورد اثرات رقابت اسپرم، اخیراً سوری نژاد (۱۳۸۹) در مطالعه خود اثرات رقابت اسپرم در هنگام لقاح مخلوط گامت مولدین ماهی آزاد دریای خزر بر میزان تنوع ژنتیکی نسل F1 را بررسی کرده است. در این مطالعه پدیده رقابت اسپرم به عنوان عامل اصلی عدم مشارکت یکسان مولدین نر شرکت کننده در فرآیند تکثیر مصنوعی ماهی آزاد دریای خزر به شیوه لقاح مخلوط گامت ها معرفی شد. همچنین آنالیز همبستگی پارامتر های اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر رابطه مثبت و معنی داری را بین مدت زمان تحرک اسپرم و تعداد نتاج تولید شده توسط مولدین نر نشان داده است. درحالی که رابطه بین میزان اسپرماتوکریت و غلظت اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر منفی بود.

مطالعاتی که در خارج از کشور انجام گرفته به شرح زیر است :

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۹ توسط Ottesen و همکارانش بر روی ماهی هالیبوت[2] صورت گرفت، از ترکیب اسپرم ۴ ماهی نر (یکبار با حجم یکسان و یکبار با تعداد مساوی) جهت لقاح تخمک های حاصل از دو مولد ماده استفاده شد. با کاهش تعداد اسپرماتوزوآ، درصد موفقیت لقاح نیز کاهش داشت. همچنین رابطه معنی داری میان تعداد اسپرم های متحرک و درصد لقاح پیدا کردند. بر اساس یافته های این محققین نتاج حاصله (۷۸ تا ۷۹درصد) مربوط به ماهی نری بود که در چهار گروه اسپرم ترکیبی، دارای بیشترین درصد اسپرم های متحرک است. همچنین شایان ذکر است که در بررسی انجام شده بصورت انفرادی روی ماهیان نر در این تحقیق، بیشترین درصد اسپرم های متحرک نیز مربوط به همان ماهی نر بود(مشابه حالت اسپرم ترکیبی).

Gage و همکارانش در سال ۲۰۰۴ با استفاده از انگشت نگاری DNA ریزماهواره ها در ماهی آزاد اطلس[3] نشان داد که سرعت نسبی اسپرم عامل اصلی تعیین کننده برتری اسپرم در عملیات لقاح می باشد. هیچ گونه رابطه معنی

---

1 - Gene tagging
2 - *Hippoglossus hippoglossus L*
3 - *Atlantic Salmon*

داری میان موفقیت بارورسازی با تعداد نسبی و طول کل اسپرم دیده نشد. سرعت خطی اسپرم دارای ارتباط مثبت و حرکت خطی اسپرم دارای ارتباط معکوس با موفقیت بارورسازی می باشد.

نتایج مطالعاتی که در خیار دریایی (Leviten,2000)، پلی کت[1] (Kupriyanova et al., 2002) و قزل آلای رنگین کمان (Lahnsteiner et al., 1998) صورت گرفته، نشان داده اند که سرعت اسپرم به عنوان عاملی تعیین کننده در موفقیت لقاح مطرح است.

Birkhead و همکارانش در سال ۱۹۹۹ مشاهده کردند که بعد از تلقیح مصنوعی در مرغ خانگی نرهای دارای اسپرم با تحرک بیشتر، در رقابت بارورسازی، میزان موفقیت بالاتری داشتند.

Mjolnerod و همکارانش در سال ۱۹۹۸ ثابت کردند که در زمان استفاده از ترکیب اسپرم چندین ماهی، ممکن است تنها اسپرم یک ماهی غالب باشد و بالای ۸۰٪ در تعیین ژنتیک نتاج نقش داشته باشد.

Donnelly و همکارانش در سال ۱۹۹۸ و همچنین (Donoghue, 1999) نشان دادند که در انسان و طیور تحرک اسپرم به عنوان عامل مهمی در قابلیت بارورسازی جنس نرعمل می کند.

Herbinger و همکارانش (۱۹۹۵) براساس آنالیز های انگشت نگاری DNA بر روی بچه ماهیان تولید شده در یک مرکز تجاری قزل آلای رنگین کمان مشاهده کردند که ۹۱٪ این نتاج مربوط به یک یا دو زوج از بین ۱۰۰ زوج ممکنه هستند. این امر ممکن است به طور ناخواسته منجر به کاهش تنوع ژنتیکی نتاج (Bekkevold *et al.*, 2002; Vladic *et al.*, 2002) و نهایتاً ایجاد همخونی و ایجاد نژاد هایی با کیفیت پایین شود.

Aas و همکارانش (۱۹۹۱) گزارش دادند که در ماهی ماهی آزاد اطلس با افزایش تراکم اسپرم میزان لقاح نیز افزایش می یابد.

۱-۱۰- فرضیات پژوهش

مهمترین فرضیه این آزمایش که اثبات یا رد آن مورد ارزیابی قرار گرفته است عبارت است از :

رقابت میان اسپرم های چند ماهی نر بر تنوع ژنتیکی نتایج نسل F1 ماهی قزل آلا مؤثر است.

---

1 - *Galeolaria caespitose*

۱-۱۱- اهداف پژوهش

در این پروژه به بررسی یکی از مهمترین مشکلات موجود در صنعت آبزی پروری یعنی رقابت اسپرم پرداخته می شود که این موضوع منجر به افزایش همخونی در میان ماهیان کشور شده که تبعات آن در حال حاضر به صورت نتایجی از جمله افزایش درصد تلفات تخم و لارو در کشور، افزایش میزان ناهنجاری ها، افزایش طول دوره پرورش، افزایش ضریب تبدیل غذا و افزایش غیر اقتصادی هزینه تولید شده و نهایتاً این اختلالات ژنتیکی به نوبه خود عدم همزمانی تفریخ تخم را به همراه خواهد داشت که منجر به عدم همزمانی شروع تغذیه فعال شده و غیریکنواختی لارو و بچه ماهی را به همراه خواهد داشت. لذا هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیر رقابت اسپرم بر تنوع ژنتیکی نتاج حاصله می باشد، به طوری که بر اساس نتایج این پژوهش می توان روش های آمیزش اسپرم و تخمک را بهینه سازی نمود تا حداکثر تنوع ژنتیکی در میان نتایج نسل F1 حاصل شود.

فصل دوم

مواد و روش کار