همبستگی پارامترهای کیفی اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* در تولید نسل F_1 در شیوه لقاح مخلوط گامتها

ایمان سوری نژاد[۱ و۲*]، محمد رضا کلباسی[۳]

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

چکیده

ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* گونه ای از خانواده آزاد ماهیان است که بدلیل افزایش فشار بر ذخایر، تکثیر مصنوعی و رهاسازی آن انجام می شود. اتخاذ شیوه لقاح مخلوط گامتها در تکثیر مصنوعی ماهی آزاد باعث نابرابر شدن میزان مشارکت مولدین نر در باروری تخمکها می شود. همبستگی پارامترهای کیفی اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر در تولید آلوینها در شیوه لقاح مخلوط گامتها در سه تیمار با استفاده از ضریب همبستگی اسپیرمن بررسی شد. در تیمار اول تخمک و مایع منی چهار مولد ماده و نر به روش متداول کارگاه و در تیمارهای دوم سوم تخمک و مایع منی به ترتیب چهار و دو مولد ماده و چهار و شش مولد نر با تعداد مساوی تخمک و حجم برابر مایع منی لقاح یافتند. پس از جذب زرده، ردیابی والدین و نسل F_1 با روش حذف در نرم افزار FAP نسخه ۳/۵ توسط ۳ جایگاه ریزماهواره پلی مورفیک Str ۵۸، Str ۷۳ و Str ۵۹۱ انجام شد. بر اساس نتایج بیش از ۹۴ درصد از آلوینها به والدین خود منتسب شدند. همبستگی مدت زمان تحرک اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر در تیمار اول مثبت (r=۰/۴۸۲ ،P=۰/۵۱۸) و در تیمار دوم (r=۱ ،P=۰) و سوم (r=۰/۹۴۳ ،P=۰/۰۰۵) معنی دار و مثبت بود. همبستگی تراکم اسپرم و میزان اسپرماتوکریت با میزان مشارکت مولدین نر در تیمارها منفی بود. نتایج تحقیق مبین تاثیر مدت زمان تحرک اسپرم بر توانایی تولید لارو در شرایط رقابت اسپرم در شیوه لقاح مخلوط گامتها توسط مولدین ماهی آزاد دریای خزر می باشد.

واژگان کلیدی: ردیابی والدین، تکثیر مصنوعی، لقاح مخلوط گامتها، تحرک اسپرم، ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius*

* نویسنده مسوول، پست الکترونیک: Sourinejad@hormozgan.ac.ir

۱. مقدمه

گونه های بسیاری از ماهیان در سراسر دنیا برای حفظ و بازسازی ذخایر طبیعی یا در جهت برداشت تجاری، در تفریخگاه مورد تکثیر مصنوعی قرار می گیرند. ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* گونه ای از خانواده آزاد ماهیان می باشد که ذخایر پر ارزش طبیعی آن طی دهه های اخیر به دلیل افزایش فشار صیادی، نابودی مکان های تخم ریزی و تخریب زیستگاه‌ها به شدت کاهش یافته است. عوامل مذکور منجر به کاهش شدید تکثیر طبیعی این گونه و قرارگیری آن در لیست قرمز IUCN شده است، لذا شیلات ایران به منظور حفظ و بازسازی ذخایر ماهی آزاد، اقدام به تکثیر مصنوعی و رهاسازی آن به رودخانه های منتهی به دریای خزر نموده است (Coad, 2000; Jalali and Mojazi Amiri, 2009)

طبق روند مرسوم سالهای گذشته تاکنون جهت تکثیر مولدین ماهی آزاد از شیوه لقاح مخلوط گامتها (Mixed Gamete Fertilization) به صورت اضافه نمودن مایع منی چند مولد نر به صورت انفرادی بر روی مخلوط تخمک مولدین ماده استفاده می شود. گزارش هایی که اخیراً به بررسی ژنتیکی اثرات اتخاذ شیوه لقاح مخلوط گامت‌ها در تکثیر مصنوعی پرداخته اند به این نکته اذعان دارند که بکارگیری این شیوه فرصت مناسبی را برای بروز پدیده رقابت اسپرم (Sperm competition) در میان ماهیان مولد نر فراهم می آورد (Wedekind *et al.*, 2007؛ Snook, 2005). رقابت اسپرم بدین معنی است که در هنگام بارورسازی تخمک‌ها، اسپرم دو یا تعداد بیشتری مولد نر برای لقاح تخمک‌ها با هم به رقابت بپردازند. بر اساس مطالعات Campton در سال ۲۰۰۴، اتخاذ شیوه لقاح مخلوط گامت‌ها در تکثیر مصنوعی باعث ایجاد رقابت اسپرمی شده و منجر به تفاوت در موفقیت تولید مثلی مولدین نر می شود. در این صورت یک یا تعداد معدودی از مولدین نر، اکثر تخمک‌ها را لقاح می دهند و در نتیجه، اغلب فرزندان ایجاد شده والدین نر یکسانی خواهند داشت و دارای تنوع ژنتیکی پایینی خواهند بود. اتخاذ شیوه لقاح مخلوط در تکثیر گونه ها از جمله در ماهی آزاد دریای خزر، راهکار مناسبی برای فراهم نمودن امکان مشارکت ژنتیکی متعادل همه مولدین در تولید فرزندان نبوده است و کاهش تنوع ژنتیکی در آلوین های تولید شده را که برای بازسازی ذخایر طبیعی استفاده می گردند به دنبال خواهد داشت (سوری نژاد و همکاران، ۱۳۸۹ ;Sourinejad *et al.*, 2011; Vera *et al.*, 2011).

به نظر می رسد موفقیت عمل لقاح و تولید لارو در شرایط رقابت اسپرم به خصوصیات مختلف اسپرم مولدین مورد استفاده از جمله حجم مایع منی (Milt volume)، تراکم اسپرم (Sperm cell density) (Neff و همکاران در سال ۲۰۰۳ در خورشید ماهی آبشش آبی *Lepomis macrochirus* از خانواده Centrachidae و گزارش Snook در سال ۲۰۰۵)، اسپرماتوکریت (Spermatocrit)، تحرک اسپرم (Sperm motility) (Linhart و همکاران در سال ۲۰۰۵ در ماهی کپور معمولی) و سرعت اسپرم (Sperm velocity) (Gage و همکاران در سال ۲۰۰۴ در ماهی آزاد اقیانوس اطلس *Salmo salar*) بستگی داشته باشد ولی ارتباط هر یک از این خصوصیات با میزان موفقیت تولید مثلی مولدین نر هنوز به طور کامل مشخص نشده است و تناقض های زیادی همانگونه که در بالا ذکر شد در گونه های مختلف در این زمینه به چشم می خورد (Burness *et al.*, 2004; Kaspar et al., 2007; Wedekind et al., 2007). جمع‌بندی مطالعات نشان می دهد که تنوع و تفاوت بسیار زیادی در پارامترهای کیفی اسپرم هم در بین و هم درون رده‌های مختلف ماهیان وجود دارد و در شیوهٔ لقاح مخلوطِ گامت‌ها به دلیل تفاوت در خصوصیاتی از قبیل حجم مایع منی، تراکم اسپرم، میزان اسپرماتوکریت، تحرک اسپرم و سرعت اسپرم پدیده رقابت اسپرم با شدت و ضعفهای مختلف به وقوع می پیوندد. بنابر این توصیه می گردد که مدیران مراکز تکثیر باید تلاش نمایند تا اثرات عوامل کاهش

دهنده تنوع ژنتیکی را با کنترل کلیه عوامل تأثیرگذار از جمله رقابت اسپرم به حداقل برسانند.

تعیین میزان مشارکت مولدین نر در لقاح تخمک‌ها و تولید فرزندان در شرایط لقاح مخلوط، به خوبی از طریق تکنیک ردیابی والدین و فرزندان (Parentage assignment) امکان پذیر است (Hara and Sekino, 2003). ظهور نشانگرهای ژنتیکی با منشا DNA خصوصاً ریزماهواره ها (Microsatellite)، ردیابی مولکولی والدین و فرزندان و تعیین مقدار تنوع ژنتیکی را در شرایط اتخاذ شیوه لقاح مخلوط گامت‌ها آسان نموده است (Liu and Cordes, 2004). نشانگرهای ریزماهواره یک نوع علائم طبیعی زیست شناختی بوده که پس از لقاح، از والدین به فرزندان منتقل می شوند و ابزار قدرتمندی برای مطالعات ردیابی مولکولی والدین و فرزندان می باشند (Jackson *et al.*, 2003; Castro et al., 2007). با توجه به نکات ذکر شده تحقیق حاضر به منظور کسب اطلاعات لازم در خصوص تعیین همبستگی بین برخی ویژگی های کیفی اسپرم از جمله میزان اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم و مدت زمان تحرک اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر در تولید آلوینها در شیوه لقاح مخلوط گامت ها در تکثیر مصنوعی ماهی آزاد دریای خزر انجام می گیرد.

۲. مواد و روش ها

تکثیر مولدین و تیمارهای تحقیق

تکثیر مولدین در کارگاه تکثیر آزاد ماهیان کلاردشت مازندران و به روش لقاح خشک صورت پذیرفت. تخمک و اسپرم مورد نیاز برای تحقیق از چهار قطعه مولد ماده (۴/۵۲ cm±۵۵/۷۵ و ۴۹۵/۶۰ gr±۱۸۲۵) و شش قطعه مولد نر (۲/۷۶cm±۵۴/۱۷ و ۲۱۲gr±۱۹۸۳/۳۳) ماهی آزاد که در یک فصل تکثیر از رودخانه چشمه کیله تنکابن صید شده بودند، استحصال گردید. شایان ذکر است تنها ۳۰ قطعه مولد نر در این فصل تکثیر رسما صید شدند که شش مولد با محدوده سنی یکسان در اختیار تحقیق حاضر قرار گرفت. در شیوه فعلی لقاح مخلوط در کارگاه تکثیر از نسبت متغیر مولدین نر به ماده و با حجم نامساوی مایع منی و همچنین تعداد نامساوی تخمک استفاده می شود. در تیمار اول این بررسی نیز منطبق با روش متداول کارگاه تخمک چهار مولد ماده (شماره ۱، ۲، ۳ و ۴) به طور کامل استحصال شده و به آرامی با هم مخلوط شدند و از مایع منی چهار مولد نر (شماره ۱، ۲، ۳ و ۴) برای باروری مخلوط تخمک‌ها استفاده گردید. شایان ذکر است در شروع استحصال تخمک و اسپرم، حدود ۶۰ گرم تخمک و ۷۵۰ میکرولیتر مایع منی برای انجام لقاح در سایر تیمارها در ظروف جداگانه جمع آوری شد. برای مقایسه نتایج با تیمار کارگاه و بررسی بهتر نقش پارامترهای کیفی اسپرم در میزان مشارکت مولدین نر در تولید آلوینها در شرایط حجم مساوی مایع منی به ازای هر مولد نر، از حجم مساوی مایع منی و تعداد مساوی تخمک در تیمارهای دوم و سوم استفاده شد. برای انجام تیمار دوم از تخمک چهار مولد ماده شماره ۱، ۲، ۳ و ۴ (۱۰۰ عدد تخمک به ازای هر مولد ماده) و مایع منی چهار مولد نر شماره ۱، ۲، ۵ و ۶ (۱۰۰ میکرولیتر به ازای هر مولد نر) استفاده گردید. در تیمار سوم از تخمک دو مولد ماده شماره ۱و ۲ و مایع منی شش مولد نر شماره ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ استفاده شد. اضافه نمودن مولدین ۳ و ۴ در تیمار سوم با هدف ارزیابی تعاملات اسپرم بین مولدین مختلف و بررسی بهتر پدیده رقابت اسپرم در حضور همه مولدین موجود صورت پذیرفت. مخلوط مایع منی مولدین نر به مخلوط تخمک مولدین ماده اضافه شد و عملیات لقاح بدون استفاده از محلول لقاح صورت پذیرفت. تخم های لقاح یافته، در تراف‌های موجود در کارگاه تا مرحله جذب کامل کیسه زرده در آلوین‌های تفریخ شده، مورد انکوباسیون قرار گرفتند. جهت حصول اطمینان از کیفیت مناسب اسپرم و تخمک مولدین مورد استفاده و همچنین حصول اطمینان از میزان زنده مانی متعادل آلوین‌های تولید شده توسط هر مولد نر پس از مراحل جذب کیسه زرده یک تیمار

شاهد برای هر تیمار اصلی در نظر گرفته شد. تخمک و اسپرم مورد نیاز برای انجام تیمار شاهد از بین مولدین مورد استفاده به طور تصادفی از یکی از مولدین ماده و یکی از مولدین نر با توجه به محدودیت مقدار اسپرم و تعداد تخمک در دسترس مولدین ماهی آزاد استحصال گردید. طراحی تیمارهای شاهد به گونه ای صورت گرفت که هر شش مولد نر و هر چهار مولد ماده امکان مشارکت در لقاح یک به یک و بررسی کیفیت اسپرم و تخمک را در سه تیمار شاهد داشته باشند و اهداف طراحی تیمار شاهد تامین شود. در تیمار شاهد، ۶۰ عدد تخمک مولد ماده با ۵ میکرولیتر مایع منی هر مولد نر به صورت انفرادی (یک ماده به یک نر) لقاح داده شد و تخم های لقاح یافته، در تراف ها توزیع گردیدند. پس از جذب کیسه زرده تعداد ۱۵ قطعه آلوین به ازای امکان تشکیل هر جفت تلاقی، نمونه برداری شده و در اتانول مطلق جهت مطالعات مولکولی تثبیت شدند. همچنین همزمان با زیست سنجی، بخشی از باله دمی مولدین جهت ردیابی مولکولی میزان قرابت آنها با فرزندان در اتانول مطلق تثبیت گردید. شمای کلی الگوی لقاح مولدین در جدول ۱ ارائه شده است.

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

تیمار	نحوه اختلاط گامت ها	نر شماره:	ماده شماره:	تعداد آلوین نمونه برداری شده (۲ تکرار)	حجم مایع منی و تعداد تخمک به ازای هر مولد
تیمار اول	♀۴ × ♂۴	۱، ۲، ۳ و ۴	۱، ۲، ۳ و ۴	۴۸۰	حجم و تعداد نابرابر
تیمار شاهد اول	♀۱ × ♂۱	۳	۱	مخلوط نمودن ۴ خانواده (۱۲۰)	۶۰ عدد تخمک، ۵ میکرولیتر مایع منی
	♀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	۱۰۰میکرولیتر مایع منی، ۱۰۰ عدد تخمک
تیمار شاهد دوم	♀۱ × ♂۱	۵	۳	مخلوط نمودن ۴ خانواده (۱۲۰)	۶۰ عدد تخمک، ۵ میکرولیتر مایع منی
	♀۱ × ♂۱	۵	۴		
	♀۱ × ♂۱	۶	۳		
	♀۱ × ♂۱	۶	۴		
تیمار سوم	♀۲ × ♂۶	۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶	۲ و ۳	۳۶۰	۱۰۰میکرولیتر مایع منی، ۱۰۰ عدد تخمک
تیمار شاهد سوم	♀۱ × ♂۱	۱	۲	مخلوط نمودن ۳ خانواده (۹۵)	۶۰ عدد تخمک، ۵ میکرولیتر مایع منی
	♀۱ × ♂۱	۲	۲		
	♀۱ × ♂۱	۳	۲		

سنجش پارامترهای کیفی اسپرم

پارامترهای کیفی اسپرم شامل میزان اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم و مدت زمان تحرک اسپرم به منظور بررسی همبستگی بین آنها با میزان مشارکت مولدین نر در تولید آلوین‌ها در شرایط لقاح مخلوط گامت ها مورد سنجش قرار گرفتند. برای سنجش تراکم اسپرم از لام هماسیتومتر و میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰× استفاده شد. جهت شمارش اسپرم، ابتدا یک میکرولیتر مایع منی در محلول رقیق کننده اسپرم که NaCl ۰/۷ درصد (Ciereszko and Dabrowski,

1993) بود با نسبت ۱ به ۱۰۰۰ رقیق گردید و سپس یک میکرولیتر از محلول رقیق شده در حفره لام هماسیتومتر قرار گرفت. دو تکرار برای تهیه رقت و سه بار شمارش اسپرم برای هر رقت انجام شد. میانگین سه بار شمارش برای هر یک از دو تکرار رقت محاسبه شد و میانگین دو عدد نهایی، جهت محاسبه تراکم اسپرم با استفاده از رابطه ۱ استفاده گردید.

رابطه۱ (Tvedt *et al.*, 2001): تعداد اسپرم = A × ۵۰۰۰۰ × ۱۰۰۰

در این رابطه مقدار A برابر با تعداد اسپرم شمارش شده در ۸۰ مربع کوچک لام هماسیتومتر، ۵۰۰۰۰ عدد محاسباتی با توجه به ابعاد لام و ۱۰۰۰ نسبت رقت می باشد.

برای سنجش میزان اسپرماتوکریت (٪)، از روش سانتریفیوژ لوله های میکروهماتوکریت حاوی مایع منی برای مدت ۱۹۵ ثانیه و دور ۱۴۰۰۰g در دستگاه میکروسانتریفیوژ استفاده شد. برای هر مولد سه تکرار منظور گردید (Wedekind *et al.*, 2007). جهت سنجش مدت زمان تحرک اسپرم ابتدا ده میکرولیتر مایع منی در یک میلی لیتر محلول رقیق کننده، رقیق شد. یک میکرولیتر از این محلول رقیق شده روی لام قرار گرفته و ۲۵ میکرولیتر آب کارگاه به آن اضافه شد. مدت زمان تحرک اسپرم از زمان اضافه نمودن آب تا هنگامی که کمتر از پنج درصد اسپرم‌ها دارای حرکت رو به جلو بودند اندازه گیری شد. سه تکرار برای این سنجش در هر مولد منظور گردید (Tvedt *et al.*, 2001).

استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلیمراز

استخراج DNA ژنومی از باله دمی مولدین و آلوین ها به روش استاندارد فنل-کلروفرم (Sambrook *et al.*, 1989) انجام شد. مولدین با استفاده از ۳ جایگاه ریزماهواره Str ۵۸، Str ۷۳ و Str ۵۹۱ که میزان بالایی از تنوع ژنتیکی را در مولدین ماهی آزاد دریای خزر نشان داده اند، تعیین ژنوتیپ گردیدند (سوری نژاد و همکاران، ۱۳۸۹؛ سوری نژاد و همکاران، ۱۳۹۱؛ Vera *et al.*, 2011). واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از ۳۰ نانوگرم DNA در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر برای هر واکنش و میزان هر پرایمر ۰/۶۶µM، مقدار dNTP برابر با ۱۰۰µM، PCR buffer با غلظت ۱ X، MgCl2 برابر با ۱/۵ mM و Taq DNA polymerase ساخت شرکت اینویتروژن آمریکا برابر با ۰/۵ U و با تنظیم دمای الحاق (جدول ۲) و برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر (MJ research PTC-100) ساخت کشور آمریکا بهینه گردید. مولدین و آلوین‌ها در جایگاه های ریزماهواره با دستگاه توالی یاب خودکار ABI PRISM® 3730 (Applied Biosystems) تعیین ژنوتیپ شدند و امتیازدهی به آلل ها با نرم افزار GeneMapper نسخه ۴ انجام شد (*et al.*, 2007; Martinez and Fernandez, 2009, Castro Vera *et al.*, 2011).

جدول ۲ جایگاههای ریزماهواره و دمای الحاق استفاده شده برای تعیین ژنوتیپ مولدان ماهی آزاد

لوکوس	ترادف	شماره بانک ژنی یا مرجع	دمای الحاق(^{o}C)
Str ۷۳	5'-CCTGGAGATCCTCCAGCAGGA-3' 5'-CTATTCTGCTTGTAACTAGACCTA-3'	Estoup و همکاران، ۱۹۹۳	۵۸
Str ۵۸	5'-AACAATGACTTTCTCTGAC-3 5'-AAGGACTTGAAGGACGAC-3'	U60223	۵۶
Str ۵۹۱	5'-CTGGTGGCAGGATTTGA-3' 5'-CACTGTCTTTCGTTCTT-3'	(۱۹۹۶ ،Guyomard و Presa)	۵۵

ردیابی والدین و آنالیز آماری

ردیابی والدین بر اساس روش حذف[1] و با استفاده از ۳ جایگاه ریزماهواره Str ۵۸، Str ۷۳ و Str ۵۹۱ از طریق نرم افزار FAP نسخه ۳/۵ انجام گردید (Taggart, 2007). 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 آلوین های تولید شده توسط هر مولد ماده و نر از فرض اولیه مشارکت متعادل در سطح معنی داری ۰/۰۵ استفاده شد (Frost *et al.*, 2006; Ottesen *et al.*, 2009). از آنالیز واریانس یک طرفه One-Way ANOVA و آزمون دانکن جهت بررسی تفاوت در خصوصیات اسپرم مولدین نر در سطح معنی داری ۰/۰۵ استفاده گردید. ارقام نمودارهای مربوط به پارامترهای اسپرم به صورت Mean±SE ارائه شد. آزمون غیر پارامتریک اسپیرمن جهت بررسی همبستگی بین خصوصیات اسپرم مولدین نر با میزان مشارکت مولدین در هر تیمار به کار رفت.

۳. نتایج

تراکم اسپرم

نتایج سنجش تراکم اسپرم در شش مولد مورد استفاده نشان داد که تراکم اسپرم از $۳۹۷\pm۸/۷۱\times۱۰^{۷}$ اسپرم در میلی لیتر مایع منی در مولد نر شماره چهار تا $۷۷۶\pm۱۲/۱۲\times۱۰^{۷}$ اسپرم در میلی لیتر مایع منی در مولد نر شماره یک متغیر بود. میزان تراکم اسپرم در مولد نر شماره چهار به طور معنی داری کمتر و میزان تراکم اسپرم در مولد نر شماره یک به طور معنی داری بیشتر از سایر مولدین نر بود ($P<0.05$). مولدین نر شماره دو و سه تفاوت معنی داری از لحاظ تراکم اسپرم نداشتند ($P>0.05$)(شکل ۱ الف).

میزان اسپرماتوکریت

میزان اسپرماتوکریت در مولدین نر از ۳۳±۳/۰۵ درصد در مولد نر شماره چهار تا ۶۲/۶۶±۰/۵۷ درصد در مولد نر شماره یک متغیر بود. میزان اسپرماتوکریت در مولد نر شماره چهار به طور معنی داری کمتر و در مولد نر شماره یک به طور معنی داری بیشتر از سایر مولدین نر بود ($P<0.05$). تفاوت معنی داری در میزان اسپرماتوکریت مولدین نر شماره دو و سه مشاهده نگردید ($P>0.05$)(شکل ۱ ب).

مدت زمان تحرک اسپرم

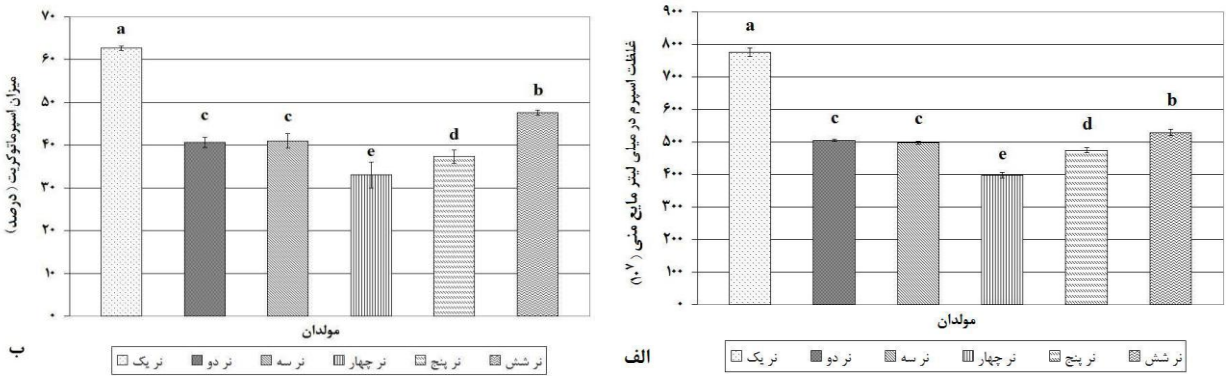
مدت زمان تحرک اسپرم در مولدین نر از ۲۳/۴۷±۰/۵۸ ثانیه در مولد نر شماره یک تا ۲۹/۹۱±۰/۵۴ ثانیه در مولد نر شماره پنج متغیر بود. مدت زمان تحرک اسپرم در مولد نر شماره یک به طور معنی داری کمتر و مدت زمان تحرک اسپرم در مولد نر شماره پنج به طور معنی داری بیشتر از سایر مولدین نر بود ($P<0.05$). مولدین نر شماره سه و چهار تفاوت معنی داری از لحاظ مدت زمان تحرک اسپرم نداشتند ($P>0.05$)(شکل ۱ ج).

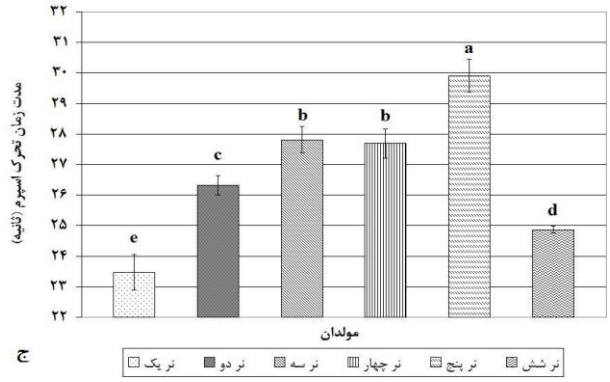
میزان موفقیت ردیابی و دامنه مشارکت مولدین نر و ماده در تولید آلوینها

جدول ۳ میزان موفقیت ردیابی و دامنه مشارکت مولدین نر و ماده در تولید آلوینها را در تیمارهای تحقیق نشان می دهد.

در تیمار اول میزان کلی مشارکت در تولید آلوین‌ها در بین مولدین نر (x^2 = ۵۲۲/۹۲، P <۰/۰۰۱) و در بین مولدین ماده (x^2 =۱۳۷/۴۶، P <۰/۰۰۱) به طور معنی داری متفاوت بود. در بین مولدین نر، مولد نر شماره سه بیش از ۶۸ درصد آلوین ها و در بین مولدین ماده، مولد ماده شماره چهار بیش از ۴۶ درصد آلوین ها را تولید نمودند (شکل ۲).

1. Exclusion

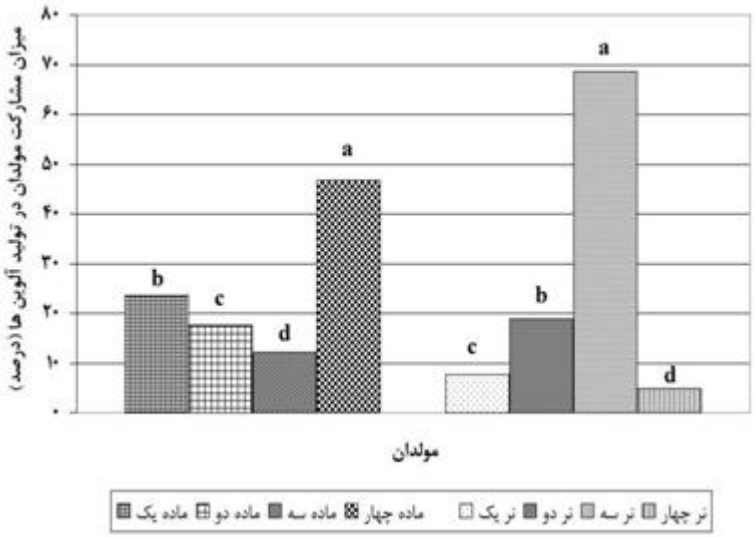




شکل ۱. (الف) تراکم اسپرم (تعداد در میلی لیتر مایع منی)، (ب) میزان اسپرماتوکریت (درصد)، (ج) مدت زمان تحرک اسپرم (ثانیه) در مولدین ماهی آزاد دریای خزر. حروف یکسان بیانگر عدم وجود تفاوت در سطح معنی داری ۰/۰۵ می باشد.

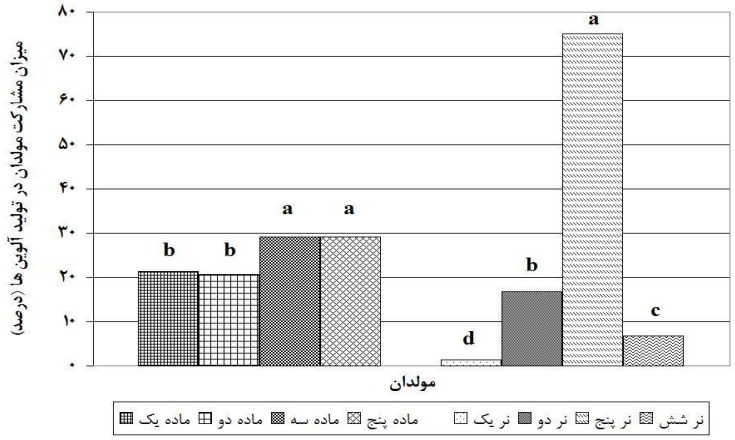
جدول ۳. میزان موفقیت ردیابی و دامنه مشارکت مولدین نر و ماده در تولید آلوینها در تیمارهای تحقیق

شاخص / تیمار	میزان ردیابی (درصد)	دامنه مشارکت مولدین	
		نر	ماده
تیمار اول	۹۸/۸	۴/۸۶ تا ۶۸/۶۲	۱۲/۱۵ تا ۴۶/۷۶
تیمار شاهد اول	۱۰۰	–	–
تیمار دوم	۹۶/۴	۱/۲۸ تا ۷۵/۱۰	۲۰/۶۰ تا ۲۹/۱۸
تیمار شاهد دوم	۱۰۰	–	–
تیمار سوم	۹۴/۴	۵/۱۸ تا ۳۳/۸۴	۴۴/۲۱ تا ۵۵/۷۹
تیمار شاهد سوم	۱۰۰	–	–



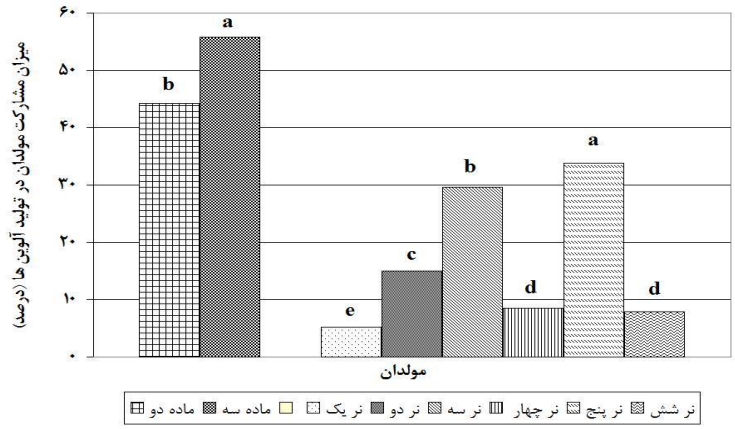
شکل ۲. مشارکت مولدین ماهی آزاد دریای خزر در تولید آلوین‌ها در تیمار اول. حروف غیر یکسان بیانگر وجود تفاوت در سطح معنی داری ۰/۰۵ می باشد.

در تیمار دوم میزان کلی مشارکت در تولید آلوین‌ها در بین مولدین نر (x^2 =۶۴۰/۶۲، P <۰/۰۰۱) و در بین مولدین ماده (x^2 =۱۱/۱۳، P =۰/۰۱۱) به طور معنی‌داری متفاوت بود. در بین مولدین نر، مولد شماره پنج به تنهایی بیش از ۷۵ درصد از آلوین‌ها را تولید نمود. بر خلاف مولدین نر، مشارکت مولدین ماده در تولید آلوین‌ها متعادل‌تر بود. دو مولد ماده شماره سه و پنج هر یک با تولید حدود ۲۹ درصد از آلوین‌ها و دو مولد ماده شماره یک و دو هر یک با تولید حدود ۲۱ درصد از آلوین‌ها تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر نداشتند (شکل ۳).



شکل ۳. مشارکت مولدین ماهی آزاد دریای خزر در تولید آلوین ها در تیمار دوم. حروف یکسان بیانگر عدم وجود تفاوت در سطح معنی داری ۰/۰۵ می باشد.

در تیمار سوم میزان کلی مشارکت در تولید آلوین‌ها در بین مولدین نر (x^2 =۱۴۵/۴۱۴، P <۰/۰۰۱) و در بین مولدین ماده (x^2 =۴/۴۰۲، P =۰/۰۳۶) به طور معنی داری متفاوت بود. در بین شش مولد نر استفاده شده، مولد نر شماره پنج حدود ۳۴ درصد از آلوین‌ها را تولید نمود. در خصوص دو مولد ماده نیز مولد شماره سه حدود ۵۶ درصد و مولد شماره دو حدود ۴۴ از آلوین‌ها را تولید کردند (شکل ۴).



شکل ۴. مشارکت مولدین ماهی آزاد دریای خزر در تولید آلوین ها در تیمار سوم. حروف یکسان بیانگر عدم وجود تفاوت در سطح معنی داری ۰/۰۵ می باشد.

در تیمارهای شاهد تفاوت معنی داری در میزان مشارکت جفت مولدینی که به صورت مجزا لقاح داده شده بودند در تولید آلوین‌ها وجود نداشت که مشخص نمود تفاوت احتمالی در میزان زنده مانی آلوین‌های تولید شده توسط هر مولد طی مراحل جذب کیسه زرده در تیمارهای اصلی میزان کلی مشارکت مولدین در تولید آلوین ها را نسبت به حالت مشارکت متعادل، در زمان نمونه برداری تحت تأثیر قرار نمی دهد (P>0.05) (شکل ۵ الف، ب و ج). همچنین نسبت به توانایی اسپرم مولدین نر در لقاح دادن تخمک‌ها و کیفیت مناسب تخمک مولدین با توجه به میانگین درصد لقاح، چشم زدگی و تفریخ بالای ۹۰ درصد تیمار شاهد اطمینان حاصل گردید.

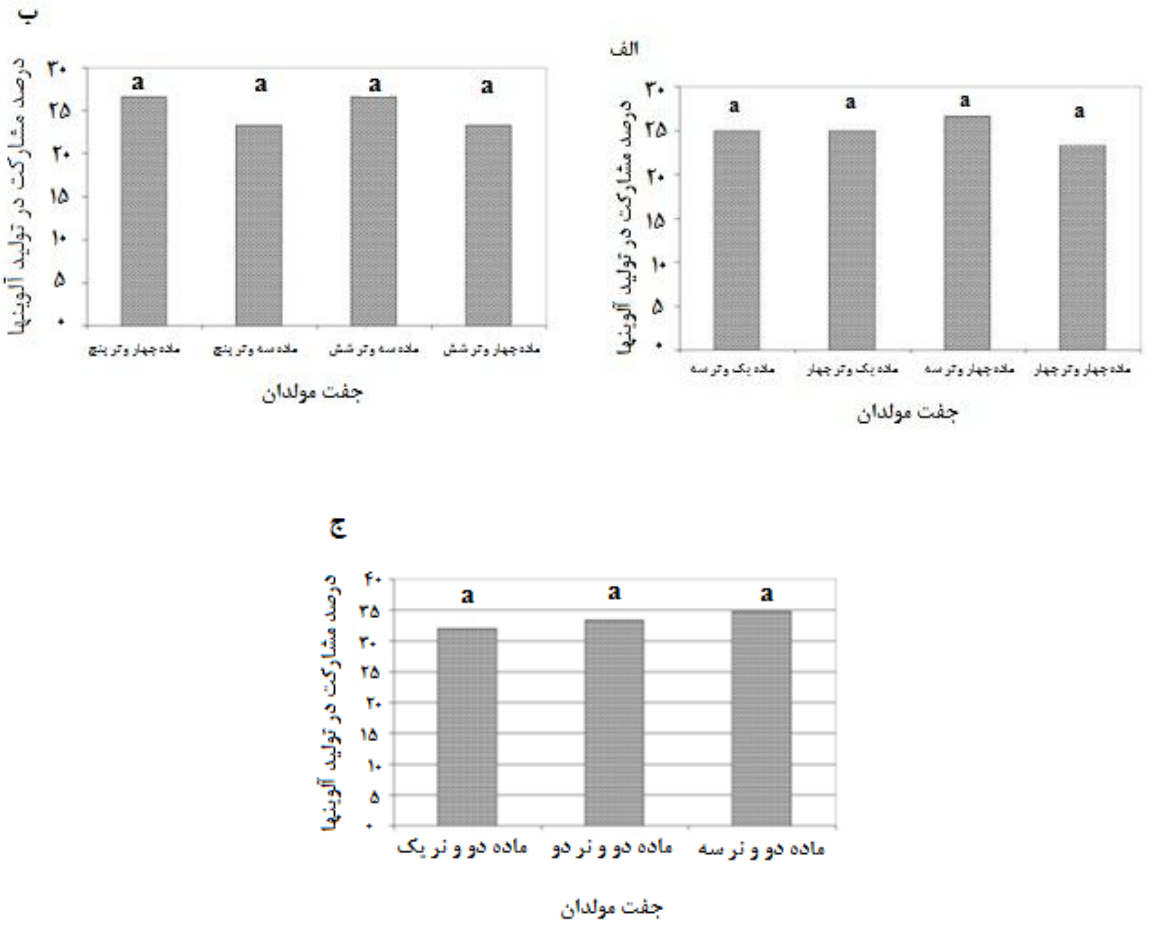
همبستگی پارامترهای کیفی اسپرم با مشارکت مولدین نر ماهی آزاد در تولید آلوین ها

در تیمار اول، همبستگی مثبتی بین مدت زمان تحرک اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر نمایان شد، هرچند این همبستگی معنی دار نبود (r=۰/۴۸۲ P=۰/۵۱۸). همبستگی میزان اسپرماتوکریت با میزان مشارکت مولدین نر (r= -۰/۱۸۶ P=۰/۸۱۴) و همبستگی تراکم اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر (r= -۰/۱۹۵ P=۰/۸۰۵) منفی بود. با خارج نمودن مولد نر شماره چهار از محاسبات، همبستگی معنی دار و مثبتی بین مدت زمان تحرک اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر به دست آمد (r=۱ P=۰). در این حالت همبستگی تراکم اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر معنی دار و منفی (r= -۱ P=۰) و همبستگی میزان اسپرماتوکریت با میزان مشارکت مولدین نر منفی بود (r= -۰/۶۳۱ P=۰/۵۶۵). مولد نر شماره سه با مدت زمان بیشتر تحرک اسپرم تعداد آلوین بیشتری نسبت به مولد نر شماره یک تولید نمود که میزان اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم بیشتری داشت (شکل های ۱ و ۲).

در تیمار دوم مدت زمان تحرک اسپرم و میزان مشارکت مولدین نر همبستگی معنی دار و مثبتی داشتند (r=۱ P=۰). همچنین همبستگی منفی و معنی داری بین میزان اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر مشاهده شد (r= -۱ P=۰). مولد نر شماره پنج با مدت زمان بیشتر تحرک اسپرم تعداد آلوین بیشتری نسبت به مولد نر شماره یک تولید نمود که میزان اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم بیشتری داشت (شکل های ۱و ۳).

در تیمار سوم نیز همبستگی معنی دار و مثبتی بین مدت زمان تحرک اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر وجود داشت (r=۰/۹۴۳ P=۰/۰۰۵). با حذف مولد شماره چهار از محاسبات، ضریب همبستگی بین مدت زمان تحرک اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر به صورت r=۱ P=۰/۰ به دست آمد. مولد نر شماره پنج

با مدت زمان بیشتر تحرک اسپرم نسبت به سایر مولدین نر، تعداد آلوین بیشتری نیز نسبت به سایر مولدین نر تولید نمود (شکل های ۱و ۴).



شکل ۵. مشارکت مولدین ماهی آزاد در تولید آلوین‌ها در تیمار شاهد اول (الف)، تیمار شاهد دوم (ب) و تیمار شاهد سوم (ج). حروف یکسان بیانگر عدم وجود تفاوت در سطح معنی داری ۰/۰۵ می باشد.

۴. بحث و نتیجه گیری

کاربرد نشانگرهای ریزماهواره در آبزی پروری و مدیریت شیلاتی در دهه گذشته رشد چشمگیری داشته است. ویژگی های خاص این نشانگرها باعث شده است که ابزار قدرتمندی برای مطالعات ردیابی مولکولی والدین و فرزندان باشند. استفاده از تعداد حداقل نشانگرهای ریزماهواره و در عین حال دست-یابی به درصد بالای موفقیت در مشخص نمودن مولدین مشارکت کننده در تولید لاروها در شیوه لقاح مخلوط گامت‌ها از اهداف عمده برنامه هایی است که تکنیک ردیابی والدین و فرزندان را در حفاظت از ذخایر ژنتیکی آبزیان به کار می برند (Castro Martinez and Fernandez, 2009 ;*et al.*, 2007). در تحقیق حاضر، استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، با میزان بالایی از قدرت ردیابی والدین در ماهی آزاد دریای خزر همراه بود. مولدین تشکیل دهنده آلوین‌ها در تیمارهای مختلف تحقیق که به شیوه لقاح مخلوط تولید شدند با بکارگیری تکنیک ردیابی والدین در نرم افزار FAP تنها با استفاده از سه نشانگر ریزماهواره Str ۵۸، Str ۷۳ و Str ۵۹۱ مشخص گردیدند. در تیمار اول ۹۸/۸ درصد، در تیمار دوم ۹۶/۴ درصد، در تیمار سوم ۹۴/۴ درصد و در تیمارهای شاهد ۱۰۰ درصد از آلوین‌ها به مولدین نر و ماده تشکیل دهنده منتسب شدند که در مقایسه با سایر تحقیقات بیانگر درصد

بالایی از ردیابی می باشد (Vandeputte *et al.*, 2004; Kim et al., 2007).

در تحقیق حاضر، میزان اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم پیش بینی کننده میزان موفقیت مولدین نر در تولید آلوین‌ها نبودند. این نتیجه بر خلاف تئوری رقابت (Parker, 1998; Ball and Parker, 2000) و گزارش Neff و همکاران در سال ۲۰۰۳ در خورشید ماهی آبشش آبی و گزارش Snook در سال ۲۰۰۵ می باشد. در تطابق با نتایج تحقیق حاضر، تعداد اسپرم عامل مشخص کننده موفقیت مولدین نر در تولید آلوین‌ها در شرایط رقابت اسپرم در ماهی آزاد اقیانوس اطلس نبود (Gage *et al.*, 2004). در ماهی قزل آلای رنگین کمان نیز تراکم اسپرم رابطه منفی با میزان مشارکت مولدین نر در لقاح تخمک‌ها داشت (Tuset *et al.*, 2008).

از میان ویژگی های کیفی اسپرم که در تحقیق حاضر در تیمارهای مختلف مورد بررسی قرار گرفتند تنها رابطه بین مدت زمان تحرک اسپرم و میزان مشارکت مولدین نر در تولید آلوین‌ها در تیمارها مثبت بود. مدت زمان بسیار کوتاه تحرک اسپرم در اغلب ماهیان استخوانی که در آزاد ماهیان حتی به کمتر از سی ثانیه نیز می رسد، تأثیر بسیار زیادی بر موفقیت لقاح مولدین نر دارد چون اسپرم باید در این مدت کوتاه میکروپیل را پیدا نموده و به داخل آن نفوذ کند. در آزاد ماهیان که تخمک درشتی دارند (قطر تخمک حدود ۵ میلی متر)، مدت زمان کوتاه تحرک اسپرم (کمتر از سی ثانیه) باعث می شود که اسپرم مسافتی در حدود نیمی از دور تخمک (۳ تا ۴/۹ میلی متر) را طی نماید. بنابراین اسپرم هایی که مدت زمان تحرک طولانی تری دارند شانس بیشتری نیز برای لقاح دادن تخمک‌ها خواهند داشت و حتی کاهش بسیار کم در مدت زمان تحرک اسپرم، تأثیر بسیار زیادی بر موفقیت تولید مثلی مولدین نر بر جای می گذارد (Kime *et al.*, 2001; Ruragwaa *et al.*, 2004).

مروری بر گزارش‌های منتشر شده در زمینه بررسی همبستگی مدت زمان تحرک اسپرم با میزان مشارکت مولدین نر در تولید آلوین‌ها، نشان دهنده برخی تناقضات در نتایج به دست آمده در گونه های مختلف می باشد. در قزل آلای رنگین کمان موفقیت تولید مثلی مولدین نر در شرایط رقابت اسپرم با مدت زمان تحرک اسپرم در ارتباط بود (Tuset *et al.*, 2008). در ماهی هالیبوت اقیانوس اطلس نیز همبستگی مثبت و معنی داری بین تحرک اسپرم و موفقیت تولید مثلی مولدین نر مشاهده گردید و بیان شد که مخلوط نمودن مایع منی چندین مولد نر مختلف بدون دانش اولیه در مورد پارامترهای تحرک اسپرم ممکن است در نهایت منجر به کاهش سطح تنوع ژنتیکی، افزایش میزان آمیزش خویشاوندی و تولید موجوداتی با میزان سازگاری کم در برابر شرایط محیطی گردد (Ottesen *et al.*, 2009). در تناقض با ماهی آزاد دریای خزر، ماهی قزل آلای رنگین کمان و ماهی هالیبوت، موفقیت تولید لارو در ماهی روغن (Trippel and Neilson, 1992) و در ماهی Walleye از خانواده سوف ماهیان (Casselman *et al.*, 2006) با میزان تحرک اسپرم همبستگی معنی داری نداشت.

در جمع‌بندی نهایی، شناسایی نشانگرهای ریزماهواره دارای تنوع ژنتیکی بالا در ماهی آزاد دریای خزر و انجام آنالیز ردیابی والدین با استفاده از آنها، با درصد موفقیت بالایی در تعیین مولدین مشارکت کننده در تولید آلوین‌ها همراه بود. تحقیقات گذشته در ماهی آزاد دریای خزر نشان داده است که شیوه لقاح مخلوط گامت‌ها که هم اکنون در تکثیر مصنوعی ماهی آزاد استفاده می شود از طریق بروز پدیده رقابت اسپرم در میان مولدین نر، باعث کاهش اندازه جمعیت مؤثر در مولدین و کاهش تنوع ژنتیکی در آلوین‌های تولید شده می شود (سوری نژاد و همکاران، ۱۳۸۹؛ Vera *et al.*, 2011). تیمارهایی مثل یکسان سازی حجم مایع منی (سوری نژاد و همکاران، ۱۳۹۱) و یکسان سازی تعداد اسپرم به ازای هر مولد نر (سوری نژاد و کلباسی، ۱۳۹۱) نیز باعث

مشارکت متعادل مولدین نر در بارور سازی تخمک‌ها و ترکیب ژنتیکی آلوین‌های ایجاد شده در شیوه لقاح مخلوط نگردیده است و اختلافات زیادی خصوصاً در میزان مشارکت مولدین نر در تولید آلوین‌ها مشاهده می شود که در نتیجه، آلوین‌هایی با کاهش سطح تنوع ژنتیکی نسبت به مولدین تولید خواهند شد. به نظر می رسد موفقیت عمل لقاح و تولید لارو در شرایط رقابت اسپرم در ماهی آزاد دریای خزر به سایر خصوصیات اسپرم مولدین مورد استفاده از جمله تحرک اسپرم بستگی داشته باشد که این موضوع در تحقیق حاضر مورد تایید قرار گرفت.

منابع

سوری نژاد، ا.، کلباسی، م.ر.، مارتینز، پ. ۱۳۸۹. ارزیابی اندازه جمعیت مؤثر مولدین و تأثیر آن بر تنوع ژنتیکی نسلF1 در شیوه فعلی تکثیر مصنوعی ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، ژنتیک نوین، دوره پنجم، شماره۱، صفحه: ۲۱-۳۰.

سوری نژاد، ا.، کلباسی، م.ر. ۱۳۹۱. یکسان سازی تراکم اسپرم مولدین نرماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* در شیوه لقاح مخلوط و تاثیر آن بر تنوع ژنتیکی نسل F_1، مجله علوم و فنون دریایی، دوره ۱۱، شماره ۱، صفحه ۴۶-۵۷.

سوری نژاد، ا.، کلباسی، م.ر.، مارتینز، پ. ۱۳۹۱. تأثیر یکسان سازی حجم مایع منی در شیوه لقاح مخلوط ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* بر میزان مشارکت ژنتیکی مولدین در تولید آلوین ها، نشریه شیلات، شماره ۱، جلد ۶۵، صفحه: ۳۹-۵۲.

Ball, M. A., Parker, G. A. 2000. Sperm competition games: a comparison of loaded raffle models and their biological implications. J. Theor. Biol. 206: 487-506.

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

Burness, G., Casselman, S. J., Schulte-Hostedde, A. I., Moyes, C. D., Montgomerie, R. 2004. Sperm swimming speed and energetics vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). Behav. Ecol. Sociobiol. 56: 65-70.

Campton, D. E. 2004. Sperm competition in salmon hatcheries: the need to institutionalize genetically benign spawning protocols. T. Am. Fish. Soc. 133: 1277-1289.

Casselman, S. J., Schulte-Hostedde, A. I., Montgomerie, R., 2006. Sperm quality influences male fertilization success in walleye (*Sander vitreus*), Can. J. Fish. Aquat. Sci. 63: 2119-2125.

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). Aquacult. 272: 210-216.

Ciereszko, A., Dabrowski, K., 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using spectrophotometric technique. Aquacult. 109: 367–373.

Estoup, A., Presa, P., Krieg, F., Vaiman, D., Guyomard, R. 1993. (CT)(n) and (GT)(n) microsatellites- a new class of genetic-markers for *Salmo trutta* L. (salmon). Heredity, 71: 488-496.

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

Gage, M. J. G., Macfarlane, C. P., Yeates, S., Ward, R. G., Searle, J. B., Parker, G.A. 2004. Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: Relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. Curr. Biol. 14: 44-47.

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

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

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

Kaspar, V., Kohlmann, K., Vandeputte, M., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Alavi,

Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory press, New York.
Snook, R. R., 2005. Sperm in competition: not playing by the numbers. Trends. Ecol. Evol. 20: 46-53.
Sourinejad, I., Kalbassi, M.cR., Pino-Querido, A., Vera, M., Bouza, C., Martinez, P. 2011. Parentage assignment of progeny in mixed milt fertilization of Caspian brown trout *Salmo trutta caspius* using microsatellite DNA markers: Implications for conservation. Afr. J. Biotechnol. 10, 26: 5084-5090.
Taggart, J. B. 2007. FAP: an exclusion-based parental assignment program with enhanced predictive functions. Mol. Ecol. Notes 7: 412-415.
Trippel, E. A., Neilson, J. D. 1992. Fertility and sperm quality of virgin and repeatspawning Atlantic cod (*Gadus Morhua*) and associated hatching success. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49: 2118-2127.
Tuset, V. M., Dietrich, G. J., Wojtczak, M., Slowinska, M., Monserrat, J. D., Ciereszko, A. 2008. Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. J. Appl. Ichthyol. 24: 393-397.
Tvedt, H. B., Benfey, T. J., Martin-Robichaud, D. J., Power, J. 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. Aquacult. 194: 191-200.
Vandeputte, M., Kocour, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M., De Guerry, D., Rodina, M., Gela, D., Vallod, D., Chevassus, B., Linhart, O. 2004. Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquacult. 235: 223-236.
Vera, M., Sourinejad, I., Bouza, C., Vilas, R., Pino-Querido, A., Kalbassi, M R., Martı´nez, P. 2011. Phylogeography, genetic structure, and conservation of the endangered Caspian brown trout, Salmo trutta caspius (Kessler, 1877), from Iran. Hydrobiologia. 664:51–67.
Wedekind, C., Rudolfsen, G., Jacob, A., Urbach, D., Muller, R. 2007. The genetic consequences of Hatchery-induced sperm competition in a salmonid. Biol. Conserv. 137: 180-188.
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. Aquacult. 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. Fish. Sci. 73: 1087-1093.
Kime, D. E., Van Looka, K. J. W., McAllister, B. G., Huyskens, G., Rurangwa, E., Ollevier, F. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. Comp. Biochem. Physiol. 425-433.
Linhart, O., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Vandeputte, M. 2005. Spermatozoal competition in common carp (*Cyprinus carpio*): what is the primary determinant of competition success?. Reprod. 130, 705-711.
Liu, Z. J., Cordes, J. F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquacult. 238: 1-37.
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.
Neff, B. D., Fu, P., Gross, M. R. 2003. Sperm investment and alternative mating tactics in bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). Behav. Ecol. 14: 634-641.
Ottesen, O. H., Babiak, I., Dahle, G. 2009. Sperm competition and fertilization success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquacult. 286: 240-245.
Parker, G. A. 1998. Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. In: Sperm Competition and Sexual Selection, London, Academic Press.
Presa, P., Guyomard, R. 1996. Conservation of microsatellites in three species of salmonids. Fish Biology, 49: 1326-1329.
Rurangwaa, E., Kime, D. E., Olleviera, F., Nash, J. P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquacult. 234: 1-28.
Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual,

Investigating the correlation between sperm quality parameters and the amount of contribution by Caspian brown trout male breeders to F1 progeny in mixed milt fertilization

Iman Sourinejad[1, 2*], Mohammad R. Kalbassi[2]

1. Ph.D. Graduated Student, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Iran
2. Assist. Prof. of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Iran

Abstract

Artificial breeding and subsequent release of the Caspian brown trout juveniles (*Salmo trutta caspius* Kessler, from Salmonidae) has been adopted by Iranian Fisheries Organization as a result of fishing pressure on its stocks. Unbalanced contribution of male breeders to F1 progeny is expected with present mixed milt fertilization of gametes. Non-parametric Spearman's correlation coefficient was used to investigate the relationship between some sperm quality parameters and the contribution of Caspian brown trout male breeders at three trials. In the first trial, fertilization was performed using ova and sperm of four male and four female breeders according to routine hatchery protocol. In the second and third trials, ova and sperm of respectively four and two female and four and six male breeders with equal number of ova and the same volume of milt were fertilized. Parentage assignment of yolk sac absorbed F_1 alevins was performed in FAP program using three polymorphic microsatellite loci (Str58, Str73 and Str591). More than 94% of mixed milt produced progeny were assigned to their parents in trials. Sperm motility duration was positively correlated with the number of sired progeny by each male in trials. The correlation was negative between sperm concentration and spermatocrit with amount of contribution by male breeders to F1 progeny. The results reveal the effect of sperm motility duration on the ability of alevin production by Caspian brown trout male breeders at sperm competition condition in mixed milt fertilization of gametes.

Keywords: Parentage assignment, Artificial breeding, mixed milt fertilization, Sperm motility, Caspian brown trout

* Corresponding Author’s E-mail: sourinejad@hormozgan.ac.ir