نشریه فن‌آوری‌های نوین در توسعه آبزی‌پروری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر / ISSN: 2008-0026 سال دوازدهم، شماره اول، بهار ۹۷ / صفحات: ۴۱-۳۰

تاثیر محلول‌های فعال‌کننده نمکی اسپرم بر موفقیت لقاح قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

***سیده‌شهربانو حسینی[۱]، حسین خارا[۱] و محمدرضا کلباسی[۲]**

[۱]عضو باشگاه پژوهشگران جوان گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

[۲]دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی نور، گروه شیلات، نور، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۱۴ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۲۵

چکیده

تحقیق حاضر در پایان فصل تکثیر (فروردین‌ماه) سال ۱۳۸۷، در مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت انجام شد. برای انجام این تحقیق، اثر ٤ محلول متفاوت فعال‌کننده اسپرم در مقایسه با آب کارگاه تکثیر بر درصد لقاح، درصد چشم‌زدگی و درصد تفریخ در قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شد. بدین‌منظور، پس از آماده‌سازی محلول‌های فعال‌کننده، از ۱۵ مولد نر و ۱۰ مولد ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان استحصال مواد تناسلی صورت پذیرفت. به‌منظور سنجش تحرک اسپرم از میکروسکوپ نوری استفاده شد و تا زمانی‌که ۹۵ تا ۹۹ درصد سلول‌های اسپرم تحرک خود را از دست دادند، به‌عنوان مدت زمان تحرک سلول‌های اسپرم در نظر گرفته شد. محلول‌های متفاوت فعال‌کننده نمکی، اختلاف معنی‌داری را در سطح ۹۵ درصد بر مدت زمان تحرک، درصد لقاح، درصد چشم‌زدگی و درصد تفریخ در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند. نتایج نشان داد که محلولی با ترکیب ۰/۷۳۵gr/L $CaCl_2.2H_2O$, NaCl, ۷/۳۰۵gr/L و pH=۷/۷ بالاترین درصد لقاح (۳/۲۶±۶۱/۲۲درصد)، درصد چشم‌زدگی (۳±۵۷/٤۸ درصد) و درصد تفریخ (۰/۵۷±۹۵/۱۸ درصد) را در مقایسه با سایر گروه‌ها نشان داد. گروه شاهد نیز در مقایسه با دیگر گروه‌ها کمترین میزان لقاح، چشم زدگی و تفریخ را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، تحرک، فعال‌ننده، قزل‌لای رنگین‌مان، کلاردشت

مقدمه

تولید تجاری ماهیان، ایجاب می‌کند که کیفیت مواد تناسلی در ماهیان مولد ارزیابی شود، به عبارتی، قابلیت لقاح مصنوعی در آنها افزایش یابد (۳٤). بهبود کیفیت مواد تناسلی مولدین و کنترل تولید مثل می‌تواند ما را در دستیابی به تقاضای روزافزون و در حال رشد آبزی‌پروری در جهان کمک کند (۲۳ و ۳۹). مایع سلومی که به همراه تخمک خارج می‌شود یک ماده پروتئینی است و در ماهیان مختلف اثرات متفاوتی در تحرک اسپرم دارد، به‌طوری‌که در ماهیان خاویاری عامل بازدارنده تحرک اسپرم بوده و به همین دلیل در هنگام لقاح ماهیان خاویاری، مایع سلومی را از تخمک‌ها جدا می‌کنند (۲٦). همچنین، اسپرماتوزوآی کفال خاکستری *Magill capito* نیز در مایع سلومی غیرفعال می‌باشد (۲۷). اگرچه اغلب مطالعات نشان از کاهش تحرک و قابلیت لقاحی اسپرم آزاد ماهیان در فاصله چند دقیقه پس از فعال‌سازی با محلول‌های فعال‌کننده نمکی یا مایع سلومیک دارد (۳٤)، مدت‌ها بعد نشان داده شد که میزان یون کلسیم در فعال‌کننده‌ها می‌تواند طول دوران تحرک اسپرم را طولانی‌تر کند (۱۵). پارامترهای

* مسئول مکاتبه: sh_hosseini_2000@yahoo.com

متفاوتی از قبیل طول کل مدت زمان تحرک، حرکت موجی شکل، میزان اسپرماتوکریت و غلظت سلول‌های اسپرم، محتوی ATP، میزان یون‌های موجود در پلاسمای منی و همچنین فعال‌کننده‌ها، ترکیبات پلاسمای منی و... همه از عواملی هستند که می‌توانند کیفیت اسپرم را تحت تاثیر قرار دهند (۱۲، ۲۰ و ۳۳). همچنین خصوصیات شیمیایی محلول‌های فعال‌کننده بر مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآ تأثیرگذار می‌باشد (٤). ولی می‌توان با استفاده از تغییر درجه حرارت، ایجاد تغییرات در pH، فشار اسمزی، هر یک از کاتیون‌ها به تنهایی و یا به حالت ترکیبی و افزایش ATP سبب افزایش تحرک اسپرم (۱۱) و به دنبال آن بالا بردن شانس لقاح تخمک‌ها شد (۲۰، ۲۵ و ۳٤).

با توجه به این مطلب که کیفیت اسپرم‌ها و تخمک‌ها در پایان دوره تکثیر کاهش می‌یابد و این مسئله سبب پایین آمدن کیفیت کار تکثیر خواهد شد، این تحقیق می‌تواند گامی در جهت بهبود فرآیند تکثیر و انجام موفق‌تر آن در پایان فصل تولید مثل باشد. هدف از انجام این تحقیق مشخص نمودن نقش محلول‌های متفاوت تقویت‌کننده بر پارامترهای کیفی اسپرم و موفقیت تکثیر قزل‌آلای رنگین‌کمان در اواخر فصل تکثیر و جایگزینی آنها با آب کارگاه جهت امکان‌سنجی انجام درصد لقاح بیشتر از طریق افزایش طول دوره و شدت تحرک سلول‌های اسپرم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای اجرای این تحقیق در اواخر فصل تکثیر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مولدین به‌طور تصادفی انتخاب شدند. جهت انجام عملیات تکثیر از ۱۰ ماهی ماده و ۱۵ ماهی نر استفاده شد. در ابتدا ماهی‌های ماده را به‌وسیله عصاره گل میخک بیهوش نموده و تخمک‌های مورد نیاز جهت لقاح تهیه گردید. جهت یکسان شدن شرایط تکثیر برای تمام تیمارها، تخمک‌های استحصال شده از ماهیان ماده، مخلوط شدند (۳۰).

پس از بیهوش کردن مولدین نر به‌طور جداگانه اسپرم‌گیری شدند. جهت انجام لقاح‌ها، به‌دلیل احتمال عقیم بودن و یا کیفیت نامناسب اسپرم در بعضی از مولدین و یا کیفیت بالای اسپرم در بعضی دیگر، اسپرم‌های مولدین نر با هم مخلوط گردید (۱۷). اسپرم مجموعاً ٤ تیمار (فعال‌کننده‌های نمکی ۱، ۲، ۳ و ٤) و یک گروه شاهد، و در هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

جهت آماده‌سازی محلول‌های تقویت‌کننده مختلف، ترکیبات مواد آزمایشگاهی مربوط به هر یک، برحسب گرم در لیتر به‌دقت توزین شدند. سپس مواد مربوط به هر تقویت‌کننده در بشر جداگانه‌ای ریخته شده و به‌وسیله دستگاه هم‌زن مغناطیسی، مواد را در یک لیتر از آب مقطر کاملاً حل نموده و سپس نسبت به تنظیم pH به‌وسیله HCl و NaOH و با استفاده از دستگاه pH متر در pH مورد نظر اقدام شد.

به‌منظور سنجش مدت زمان تحرک اسپرم‌های مولدین و سنجش تاثیر گروه شاهد بر مدت زمان تحرک اسپرم، یک قطره اسپرم را روی لام در زیر میکروسکوپ قرار داده و یک قطره آب مقطر را با آن مخلوط نموده و مدت زمان تحرک اسپرم بلافاصله با استفاده از کرنومتر ثبت گردید. مدت زمان تحرک اسپرم تا زمانی‌که تحرک ۹۵ الی ۹۹ درصد میزان اسپرم‌ها متوقف شوند در نظر گرفته شد (۱۲، ۱۷، ۲۵ و ۲۸). این آزمایش برای فعال‌کننده‌های ۱، ۲، ۳، ٤ و گروه شاهد، حداقل در ۳ تکرار صورت پذیرفت.

جهت انجام لقاح در هر تیمار، ۳ دسته تخمک با حجم ۳۰ سی‌سی توسط پیمانه از تخمک‌های مخلوط شده مولدین ماده جدا گردید و با استفاده از تنظیف، مایع حفره شکمی از تخمک‌ها جدا گردید. جداسازی مایع حفره شکمی جهت جلوگیری از خطا صورت گرفت زیرا مایع حفره شکمی خود یک فعال‌کننده اسپرم می‌باشد (۱۷).

جدول ۱- ترکیبات ٤ محلول انتخاب شده جهت انجام لقاح‌ها برحسب گرم بر لیتر (لرستانی، ۱۳۸۳)

مواد / محلول	pH	NaH CO_3	$MgSO_4.7H_2O$	KCl	Glycin	Tris	$CO(NH_2)_2$	$CaCl_2.2H_2O$	NaCl	منبع
	۷	آب مقطر								گروه شاهد
محلول ۱	۷/٦	–	–	–	–	–	٤/٥٠	۰/۲	٦	احمدی، ۱۳۷۱
محلول ۲	۸/٤	–	–	–	۳/۷٥	۲/٤۲	–	–	٥/٥٤	Billard, 1990
محلول ۳	۸	۸/٤۰	–	–	–	–	–	–	–	علوی، ۱۳۷۹
محلول ٤	۷/۷	–	–	–	–	–	–	/۷۳	۷/۳۰	Billard, 1992

سپس هر دسته تخمک را جداگانه در ظروف پلاستیکی متوسط قرار داده و برای هر ظرف، ۰/۳ سی‌سی اسپرم با استفاده از میکروپیپت برداشته شد و با تخمک‌های موجود در آن کاملاً مخلوط گردید. به‌منظور فعال‌سازی اسپرم و انجام عمل لقاح ۳ سی‌سی آب مقطر در تیمار گروه شاهد به هر ظرف اضافه شد و به‌مدت ۲ دقیقه کاملاً هم زده شد تا لقاح کامل گردد. عمل لقاح در تیمارهای متفاوت فعال‌کننده نمکی دقیقاً مشابه گروه شاهد انجام شد ولی با این تفاوت که در تیمارهای مربوط به فعال‌کننده‌های نمکی، از ۳ سی‌سی از آن محلول‌ها به جای آب، جهت فعال‌سازی اسپرم و تکمیل لقاح استفاده گردید. سپس جهت حذف اسپرم‌های اضافه و پوسته‌ها، تخم‌های موجود در هر ظرف، به‌دقت شستشو شدند. در مرحله بعد یک تراف آبگیری شد و جریان ملایمی از آب در آن ایجاد شد. تخمک‌های لقاح یافته موجود در ظروف پلاستیکی بعد از شستشو، در آبکش‌هایی که قبلاً شماره‌گذاری شده بودند قرار گرفته و جهت جذب آب به‌مدت ۳۰ دقیقه در تراف قرار گرفتند و سپس جهت انکوباسیون، تکرارها به‌طور تصادفی در انکوباتورهایی که از قبل آماده شده بود، قرار گرفتند (شرایط معمول کارگاه).

طبق گزارش‌های Bromage و Cumaranatunga (۱۹۹۸) و بیلارد و همکاران (۱۹۹۵) بهترین زمان برای تعیین میزان لقاح در قزل‌آلای رنگین کمان ٦ الی ۷ روز پس از لقاح می‌باشد، در این حالت بهترین همبستگی بین میزان لقاح و میزان بقاء آنها تا رشد و نمو بعدی وجود دارد و می‌توان از این طریق میزان بازماندگی آنها را در مراحل بعدی با اطمینان بالایی پیش‌بینی کرد، بدین لحاظ در حدود ۱۰۰ عدد تخمک، پس از شفاف‌سازی به‌وسیله محلول شفاف‌کننده[۲]، مشاهده شده و نمونه‌های دارای کمربند عصبی مورد شمارش قرار گرفتند. میزان لقاح تخمک‌ها مطابق رابطه ذیل محاسبه شده و ثبت گردید.

۱۰۰× (تعداد کل تخمک‌ها/تعداد تخمک‌های لقاح یافته)=میزان لقاح

بسته به درجه حرارت آب، حدود ۱۹ روز پس از لقاح، با روش شوک‌دهی تخم‌های چشم‌زده از تخم‌های تلف شده مشخص گردید (۲ و ۱۲). بدین‌منظور پس از خروج محتوی تخم‌ها به‌وسیله سیفون از داخل سینی‌هایی درون تراف، تخم‌ها را از فاصله ۲۰ سانتی‌متری در سینی دیگری تخلیه کرده، طی این عمل تخم‌های لقاح نیافته یا تلف شده، سفید شده و تغییر رنگ می‌دهند (۲). تخم‌های تلف شده با استفاده از پوآر جمع‌آوری شده و مورد شمارش قرار گرفتند. تخم‌های چشم‌زده نیز در این مرحله به‌دقت شمارش شدند و میزان بازماندگی تخم‌ها تا مرحله چشم‌زدگی از طریق رابطه ذیل محاسبه و ثبت شد.

1- Clearing solution (Stockard's solution): Formaldehyde 5%+Acetic acid 4%

= میزان چشم‌زدگی

×۱۰۰ (تعداد تخمک‌های لقاح یافته/تعداد تخمک‌های چشم‌زده)

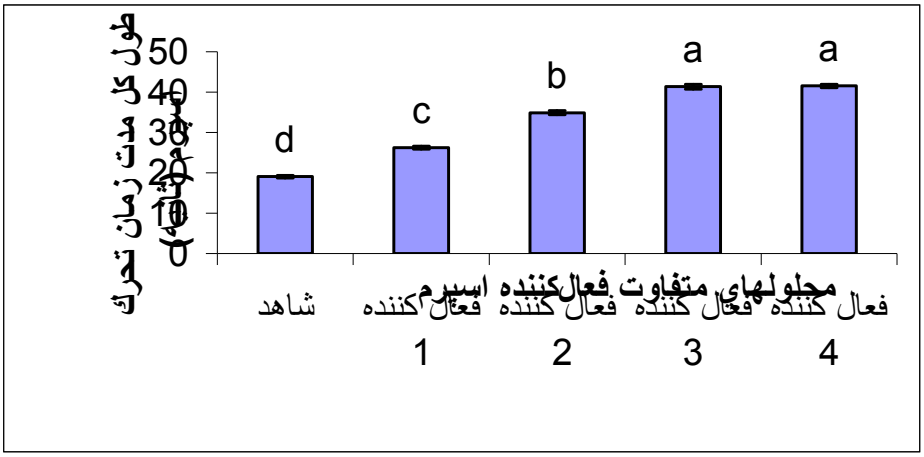
بعد از جمع‌آوری تلفات در روز چشم‌زدگی، تخم‌های چشم‌زده پس از شمارش در سینی‌های چشمه درشت قرار گرفتند. با تفریخ شدن تخم‌ها و خارج شدن لارو و پوسته از چشمه سینی به درون تراف، تخم‌های تفریخ نشده و تلف شده در سینی‌ها باقی ماندند که پس از شمارش آنها میزان تفریخ از طریق رابطه ذیل به‌دست آمده و ثبت گردید.

×۱۰۰ (تعداد تخم‌های چشم زده/ تعداد لارو) = میزان تفریخ

تجزیه و تحلیل آماری: اطلاعات جمع‌آوری شده از بررسی‌ها و مطالعات میدانی و آزمایشگاهی با استفاده از نرم‌افزار SPSS و به شرح زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. ابتدا تایید نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov صورت گرفت. جهت سنجش تأثیر محلول‌های متفاوت فعال‌کننده نمکی اسپرم بر روی میزان لقاح، چشم‌زدگی و تفریح از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) استفاده شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۹۵ درصد استفاده گردید.

نتایج

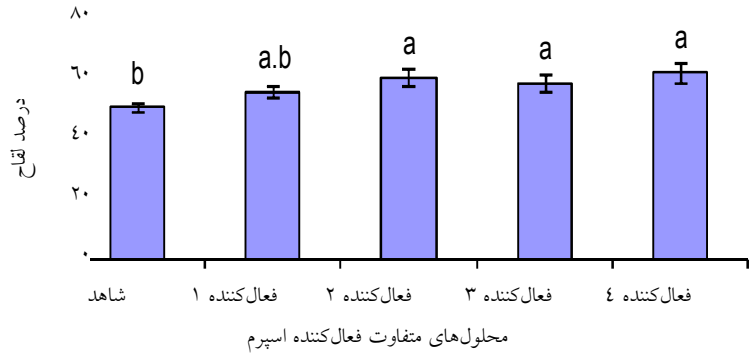
اثر محلول‌های متفاوت فعال‌کننده اسپرم بر طول کل دوره تحرک اسپرم: نتایج تجزیه واریانس یک‌طرفه نشان داد طول کل دوره تحرک اسپرم حاصل از استفاده فعال‌کننده‌های متفاوت اسپرم در گروه‌های متفاوت مولدین نر اختلاف معنی‌داری را با هم نشان می‌دهند (f=٤٤٨/٨٩٥, df=٤, P=٠/٠٠٠). نتایج آزمون چند دامنه‌ای دانکن بر طول کل دوره تحرک اسپرم نشان داد که در بین گروه‌های متفاوت مولدین نر، فعال‌کننده ۳ (٤١/٣٥±٠/٦٢ ثانیه) و ٤ (٤١/٥٤±٠/٤ ثانیه) اختلاف معنی‌داری با هم نداشته و هر دو فعال‌کننده بالاترین طول کل دوره تحرک اسپرم را دارا بودند. در مقام مقایسه و در مراحل بعدی به‌ترتیب فعال‌کننده ۲ (٣٤/٩±٠/٥١ ثانیه)، ۱ (٢٦/٢٢±٠/٣٩ ثانیه) و گروه شاهد (١٩/٠٧±٠/٣٢ ثانیه) قرار گرفتند که گروه شاهد کمترین مدت زمان تحرک کل اسپرم را در بین گروه‌ها سبب گردید (شکل ۱).



شکل ۱- اثر محلول‌های متفاوت فعال‌کننده اسپرم بر طول کل مدت زمان تحرک اسپرم

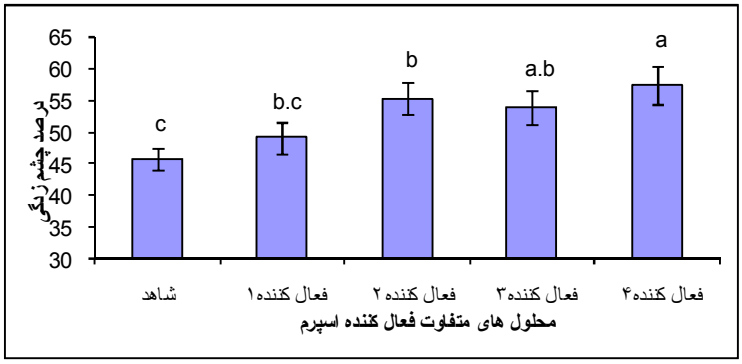
اثر محلول‌های متفاوت فعال‌کننده اسپرم بر میزان لقاح تخمک‌ها: میزان لقاح حاصل از استفاده فعال‌کننده‌های متفاوت اسپرم اختلاف معنی‌داری را با هم نشان می‌دهند (f=٣/٣٥٨ df= ٤, P=٠/٠١٨). نتایج آزمون چند دامنه‌ای دانکن بر میزان لقاح نشان داد که میزان لقاح بین فعال‌کننده ٤ (٦١/٢٢±٣/٢٦

درصد)، ۳ (۲/۷۷±۵۷/۶۸ درصد) و ۲ (۲/۶۶±۵۹/۳۱ درصد) اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند، اما از نظر عددی فعال‌کننده ٤ بالاترین میزان لقاح را دارا بود. فعال‌کننده ۱ (۱/۶۲±۵۵/۰۳ درصد) که در مقام بعدی قرار گرفت حد واسط بین فعال‌کننده ۲ و گروه شاهد (۱/۳۱±٤۹/۶۹ درصد) بود. گروه شاهد هم کمترین میزان لقاح را در بین گروه‌ها سبب شد (شکل ۲).



شکل ۲- اثر محلول‌های متفاوت فعال‌کننده اسپرم بر میزان لقاح تخمک‌ها

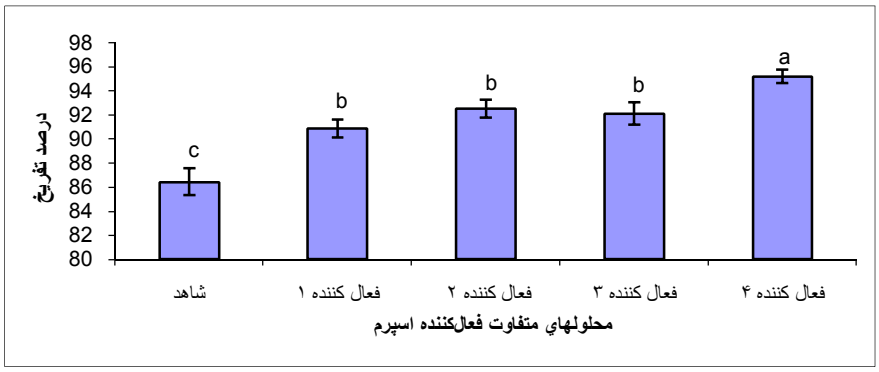
اثر محلول‌های متفاوت فعال‌کننده اسپرم بر میزان چشم‌زدگی تخمک‌ها: میزان چشم‌زدگی حاصل از استفاده فعال‌کننده‌های متفاوت اسپرم اختلاف معنی‌داری را با هم نشان می‌دهند (P=۰/۰۱٤ ,f=۳/۵۵٦,df=٤). نتایج آزمون دانکن بر میزان چشم زدگی نشان می‌دهد که فعال‌کننده ٤ (۳±۵۷/٤۸ درصد) بالاترین میزان چشم‌زدگی را در بین گروه‌های متفاوت مولدین دارا بود. فعال‌کننده ۲ (۲/۵۱±۵۵/۳۸ درصد) در مقام بعدی قرار داشته و فعال‌کننده ۳ (۲/۷٦±۵۳/۹٦ درصد) حدواسط بین فعال‌کننده‌های ۱ و ۲ قرار گرفته است. فعال‌کننده ۱ (۲/۵۱±٤۹/۲ درصد) حدواسط بین فعال‌کننده ۲ و گروه شاهد (۱/٦۷±٤۵/۷۷ درصد) قرار گرفته و گروه شاهد کمترین میزان چشم‌زدگی در بین گروه‌ها را سبب گردید (شکل ۳).



شکل ۳- اثر محلول‌های متفاوت فعال‌کننده اسپرم بر میزان چشم‌زدگی تخمک‌ها

اثر محلول‌های متفاوت فعال‌کننده اسپرم بر میزان تفریخ تخمک‌ها: میزان تفریخ حاصل از استفاده فعال‌کننده‌های متفاوت اسپرم اختلاف معنی‌داری را با هم نشان می‌دهند (f=۱٤/۵۳٦, df= ٤, P=۰/۰۰۰). نتایج آزمون چند دامنه‌ای دانکن بر میزان تفریخ نشان داد که فعال‌کننده ٤ (۰/۵۷±۹۵/۱۸ درصد) بالاترین

میزان تفریخ در بین گروه‌ها را سبب گردید. فعال‌کننده ۱ (۰/۷۵±۹۰/۸٤ درصد)، ۲ (۰/۷۳±۹۲/۵ درصد) و ۳ (۰/۹۲±۹۲/۰۹ درصد) در مراحل بعدی قرار گرفتند که اختلاف معنی‌داری بین آنها وجود نداشت اما از نظر عددی فعال‌کننده ۲ بالاتر از فعال‌کننده ۱ و ۳ قرار گرفت. گروه شاهد (۱/۱۲±۸٦/٤ درصد) در بین گروه‌ها کمترین میزان تفریخ را داشت (شکل ٤).



شکل ٤- اثر محلول‌های متفاوت فعال‌کننده اسپرم بر میزان تفریخ تخمک‌ها

بحث

با مشاهده ترکیبات فعال‌کننده‌های متفاوت (جدول ۱) مشاهده می‌شود که یون کلسیم که یون ضروری جهت آغاز تحرک اسپرماتوزوآ در اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است (۲۲) در ترکیب فعال‌کننده ٤ وجود دارد. یون کلسیم مهم‌ترین فاکتور جهت القاء و تمدید مدت زمان تحرک اسپرم می‌باشد (۵ و ٦). در ترکیب فعال‌کننده ۳ یون سدیم وجود دارد، از آنجا که با اضافه نمودن ۱ میلی‌مول کلسیم به محلول‌های فعال‌کننده اسپرم، مدت زمان تحرک اسپرم فراتر از ۳۰ ثانیه به طول می‌انجامد (۲۱) و از طرفی وجود یون‌های کلسیم و سدیم نیز اثر تقویت‌کنندگی بر مدت زمان تحرک اسپرم دارند (۱۱). پس عملکرد مناسب‌تر فعال‌کننده ۳ و ٤ بر مدت زمان تحرک اسپرم نسبت به فعال‌کننده‌های دیگر و اثر این دو فعال‌کننده بر افزایش مدت زمان تحرک اسپرم در مقایسه با گروه شاهد قابل توجیه می‌باشد.

اثر دما و pH بر تحرک اسپرم ماهیان توسط علوی و کوسون (۲۰۰۵) بررسی شد. تحرک اسپرم فاکتور کلیدی جهت ارزیابی کیفی مایع منی و قابلیت لقاحی آن می‌باشد. در آزاد ماهیان تحرک اسپرم به‌وسیله k^+ کنترل می‌شود و در دیگر ماهیان آب شیرین و گونه‌های آب شور، فشار اسمزی، عامل کنترل تحرک می‌باشد. فاکتورهای دیگر مثل غلظت متابولیت‌های محیطی و یون‌های Mg^{2+}، Ca^{2+}، pH و دما نیز بر خصوصیات تحرک اسپرم تأثیر می‌گذارند. نتایج نشان می‌دهد که تحرک و قابلیت لقاحی و سرعت اسپرماتوزوآ و همچنین طول دوره تحرک اسپرم، وابسته به دمای محیط سنجش است و همچنین دمای محیط نگهداری ماهیان مولد نیز بر پارامترهای یاد شده تأثیر دارد. pH محیط شنای سلول‌های اسپرم و محیط بیرون سلولی اسپرماتوزوآ، کمترین تأثیر را بر پارامترهای تحرک اسپرم در کپور ماهیان، آزاد ماهیان و ماهیان خاویاری دارد. یافته‌های تحقیق فوق نتایج بررسی این محققان را تأیید می‌کند.

در شکل ۱ مشاهده می‌شود که فعال‌سازی اسپرم به‌وسیله گروه شاهد کمترین مدت زمان تحرک را در مقایسه با سایر فعال‌کننده‌ها نشان می‌دهد. اسپرماتوزوآ بعد از قرار گرفتن در معرض آب تغییرات ساختاری سریعی در جهت نابودی نشان می‌دهد و به این دلیل عمر گامت‌ها در آب بسیار کوتاه می‌باشد (۲۰). با استفاده از فعال‌کننده‌ها مانند محلول نمکی در اسپرم

ماهی کپور نشان داده شده که محلول‌های فعال‌کننده نمکی باعث حفظ ساختار تاژک اسپرم شده و در نتیجه مدت زمان تحرک در مقایسه با آب بالاتر می‌رود (۱).

نتایج این تحقیق نیز تأیید کننده نتایج بیلارد (۱۹۹۲) و احمدیان (۱۳۸۱) می‌باشد زیرا مدت زمان تحرک اسپرم در فعال‌کننده‌ها در مقایسه با آب بیشتر بوده و تفاوت معنی‌داری را با آن نشان می‌دهد. Rurangwa و همکاران (۲۰۰٤) و Liley و همکاران (۲۰۰۲) دامنه مدت زمان تحرک اسپرم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را کمتر از ۳۰ ثانیه گزارش نمودند. لرستانی و همکاران (۱۳۸۳) در به‌کارگیری فعال‌کننده ٤، در لقاح‌های اول فصل تکثیر، نتایج رضایت‌بخشی را از این فعال‌کننده گزارش کردند که در اینجا، علاوه بر تأئید نتایج تحقیق لرستانی و همکاران (۱۳۸۳)، این فعال‌کننده، فعال‌کننده مناسبی جهت لقاح‌های آخر فصل تکثیر گزارش می‌شود.

تحرک اسپرم در ماهیان (اثرات یون‌ها و اسمولالیتی) توسط علوی و کوسون (۲۰۰٦) مرور شد. در این مطالعه بیان شده است که بین ترکیبات پلاسمای منی و اسمولالیتی و مدت زمان فعالیت اسپرم ماهیان، ارتباط واضح و روشنی وجود دارد. پارامترهای متفاوتی مثل غلظت یون‌های پتاسیم، سدیم و کلسیم، فشار اسمزی، pH، دما و میزان رقیق‌سازی، می‌توانند تحرک اسپرم را تحت تاثیر قرار دهند که یافته‌های این تحقیق نتایج تحقیق فوق را تایید می‌کند.

افزایش میزان لقاح با استفاده از فعال‌کننده‌های نمکی در مقایسه با گروه شاهد را می‌توان به دلایل متعددی توجیه نمود. واضح است که افزایش مدت زمان تحرک اسپرم، شانس رسیدن اسپرم‌ها به میکروپیل و انجام عمل لقاح را افزایش می‌دهد که نتیجه آن افزایش میزان لقاح تخمک‌ها می‌باشد. از آنجا که نقطه منحصربه‌فردی جهت نفوذ اسپرماتوزوآ (میکروپیل) وجود دارد و طول مسیر حرکت یک اسپرماتوزوآ (۳ میلی‌متر) کوتاه‌تر از قطر تخمک (٦-٤ میلی‌متر) می‌باشد بنابراین یک اسپرماتوزوآ، در نزدیکی تخمک شانس رسیدن به میکروپیل را ندارد (۲۰) پس واضح است افزایش مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآ شانس رسیدن آنها را به میکروپیل زیادتر می‌نماید.

زمانی‌که از آب جهت فعال‌سازی اسپرم استفاده شود، هم اسپرماتوزوآ و هم تخمک صدمه می‌بینند. در تخمک سوراخ میکروپیل سریعاً به‌وسیله تولیدات حاصل از واکنش لایه بیرونی که سریعاً بعد از غوطه‌وری در آب ایجاد می‌شود، بسته می‌شود در حالی‌که در استفاده از فعال‌کننده‌های نمکی این مشکلات وجود ندارد. احتمال ترکیدن تخمک‌های مولدین ماده جوان به‌دلیل پوسته نازک تخمک در آنها در حین تخم‌کشی زیاد می‌باشد. با توجه به این مطلب که هرگاه بیشتر از ۱ درصد از تخمک‌ها بترکند، لقاح دیگر میسر نمی‌باشد و با توجه به این امر که مهم‌ترین مزیت فعال‌کننده‌های نمکی، امکان کسب میزان لقاح بالا زمانی‌که تخمک‌ها به‌وسیله زرده حاصل از شکستن تخمک‌ها آلوده شوند، می‌باشد. پس بالا بودن میزان لقاح (شکل ۲) و به‌دنبال آن بالا بودن میزان چشم‌زدگی (شکل ۳) در فعال‌کننده ٤ در مقایسه با گروه شاهد به‌خوبی قابل توجیه می‌باشد (۲۰). استفاده از فعال‌کننده‌های نمکی حتی می‌تواند به‌عنوان یک عامل ضدعفونی‌کننده در مراحل اولیه لقاح باشد و انتقال بیماری را در هنگام لقاح کاهش دهد (۲۰). همان‌طور که در نتایج مشهود می‌باشد فعال‌کننده‌های متفاوت در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را بر میزان چشم‌زدگی و تفریخ تخمک‌ها نشان داده‌اند و با در نظر گرفتن کل تخمک‌های قابل لقاح در مراکز تکثیر قزل‌آلای رنگین‌کمان، و استفاده از این محلول‌های نمکی، واضح است که رقم قابل توجهی به‌میزان تولید لارو در کشور افزوده خواهد شد.

اثر رقیق‌کننده‌های مختلف بر مدت زمان تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توسط کلباسی و

لرستانی (۱۳۸۵) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تحقیق بالا، نشان داد محلول‌های فعال‌کننده نمکی متفاوت اسپرم، در مقایسه با گروه شاهد، مدت زمان تحرک اسپرم بالاتری را سبب گردیده‌اند و فعال‌کننده‌های نمکی اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان دادند. یافته‌های این تحقیق نیز نتایج تحقیق بالا را تایید می‌کند.

شکل ۳ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار فعال‌کننده‌های نمکی بر میزان چشم‌زدگی تخمک‌ها نسبت به گروه شاهد می‌باشد که فعال‌کننده ٤ میزان بالاتر چشم‌زدگی را باعث شده است و گروه شاهد دارای کمترین میزان چشم‌زدگی بوده است. همان‌گونه که در قبل هم اشاره شد، هرگاه غلظت اسپرم کاهش یابد، افزایش مدت زمان تحرک اسپرم که نشان‌دهنده زمان لازم برای انجام عمل لقاح است می‌تواند اثرات کاهش غلظت اسپرم را جبران کند (۱۸). این ارتباط بین غلظت اسپرم و مدت زمان تحرک می‌تواند به‌ورت یک رابطه دو طرفه باشد. از آنجا که مدت زمان تحرک اسپرم در آزاد ماهیان کوتاه می‌باشد و کل مدت زمان تحرک آن در حضور آب کمتر از ۳۰ ثانیه می‌باشد (۱۸) پس افزایش مدت زمان تحرک اسپرم، شانس رسیدن اسپرماتوزوآها را به میکروپیل و انجام فرآیند لقاح را بیشتر می‌کند که نتیجه آن افزایش میزان لقاح و افزایش رسیدن تخمک‌ها به مرحله چشم‌زدگی می‌باشد. بیلارد (۱۹۹۲) گزارش نمود که ۱۰۰ درصد میزان اسپرم‌های قزل‌آلا در حضور تقویت‌کننده ٤ تحرک دارند. تحرک کل اسپرم‌ها در این تقویت‌کننده در مقایسه با گروه شاهد می‌تواند دلیل دیگری برای افزایش میزان چشم‌زدگی باشد.

از طرف دیگر عمل و عکس‌العمل‌های ترکیبات یونی در پلاسمای منی از طریق تنظیم ترکیبات یونی داخل سلولی و یا تغییرات فشار اسمزی داخل و بیرون سلولی، نه تنها در مکانیزم‌های شروع تحرک اسپرم، بلکه در تنظیم فعالیت اسپرم و الگوی رفتاری بعد از شروع فعالیت نقش دارد. تحقیقات اخیر بر روی چگونگی این ارتباطات، نشان‌دهنده حساسیت زیستی اسپرماتوزوآی ماهیان به‌مقدار غلظت یون‌های موجود در پلاسمای منی می‌باشد (۲۵).

در شکل ٤ دیده می‌شود که فعال‌کننده ٤ دارای بالاترین میزان تفریخ و گروه شاهد کمترین میزان تفریخ را در بین فعال‌کننده‌های دیگر سبب گردیدند. از آنجایی که یون‌های سدیم و کلسیم می‌توانند عمل جلوگیری‌کننده پتاسیم را در مایع منی بر روی تحرک اسپرم کاهش دهند (۲۹ و ۳٦). در این میان این اثر برای یون‌های دو ظرفیتی مانند کلیسم شدیدتر می‌باشد و شاید به‌دلیل وجود یون کلسیم در ترکیب فعال‌کننده ٤، عملکرد آن در مقایسه با فعال‌کننده‌های دیگر بهتر بوده است. کلسیم در رفتار اسپرم بعد از آغاز تحرک، نقش تنظیمی ایفاء می‌نماید به‌طوری‌که با افزایش غلظت خارج سلولی یون کلسیم، مدت زمان تحرک اسپرم افزایش می‌یابد (۲۲). نزدیک بودن pH فعال‌کننده ٤ به pH مایع منی مزیت دیگری را نیز دارا می‌باشد و آن وارد نشدن شوک اختلاف pH فعال‌کننده و مایع منی به سلول‌های اسپرم می‌باشد که نتیجه آن حصول لاروهای فراوانتر در پایان دوره تکثیر می‌باشد. طبیعی است که در لقاح‌های آخر فصل تکثیر که کیفیت اسپرم‌ها کاهش یافته‌اند، اسپرم‌های دارای طول دوره تحرک بالاتر، لقاح‌های بالاتر و در نتیجه، درصد چشم‌زدگی و تفریخ بالاتری را داشته باشند.

Ottesen و Babiak (۲۰۰۷) در تحقیقی که در آن اثر خصوصیات والدین بر میزان موفقیت لقاح و تفریخ و توسعه جنین و لارو در ماهی *hippoglossus Hippoglossus*، را بررسی کرده بودند، نشان دادند که ارتباط بین میزان لقاح و موفقیت تفریخ تخم‌ها، ارتباطی مثبت می‌باشد. نتایج این تحقیق یافته‌های تحقیق بالا را تایید می‌کند.

از آنجا که pH محیط لقاح تأثیرات برجسته‌ای را در موفقیت لقاح دارا می‌باشد (١٦) و شرایط قلیایی مشابه یا بالاتر از pH مایع منی یا مایع سلومیک باعث تحرک و لقاح بیشتر در اسپرماتوزوآی آزاد ماهیان می‌گردد (۲۵) و pH مایع منی معمولاً بالاتر از ۷/۵ است (۲۲) همچنین pH مایع سلومیک نیز ۸/۲۵ تا ۸/٦٥ می‌باشد (۱۵ و ۳۱).

همان‌طور که در نتایج مشهود می‌باشد فعال‌کننده‌های متفاوت در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را بر میزان چشم‌زدگی و تفریخ تخمک‌ها نشان داده‌اند و با در نظر گرفتن کل تخمک‌های قابل لقاح در مراکز تکثیر قزل‌آلای‌رنگین‌کمان، و استفاده از این محلول‌های نمکی، واضح است که رقم قابل توجهی به‌میزان تولید لارو در کشور افزوده خواهد شد.

منابع

۱-احمدیان، ن.، مجازی‌امیری، ب.، ابطحی، ب.، نظری، ر.م.، ۱۳۸۱. استفاده از تقویت‌کننده‌های اسپرم در لقاح تخمک تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus*، دومین همایش ملی منطقه‌ای ماهیان خاویاری، صفحات ۱۱۱ تا ۱۱۵,

۲-پیکان‌حیرتی، ف. ۱۳۸۰. القاء تکثیر در جنس نر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از هورمون سنتتیک GnRH، پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشگاه تهران، دانشکده منابع طبیعی کرج، ۱۳۸۰، ۷۷ ص.

۳-احمدی، م.ر.، ۱۳۷۱. اصول تکثیر و پرروش ماهی، دانشکده دامپزشکی، ٥٤ ص.

٤-علوی، س.م.ه.، ۱۳۷۹. مطالعه تطبیقی مدت زمان تحرک اسپرم تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* در آب سالن انکوباسیون و محلول‌های تقویت‌کننده، پروژه کارشناسی، کرج: دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۵۰ ص.

۵-کلباسی، م.ر.، و لرستانی، ر.، ۱۳۸۵. اثر رقیق‌کننده‌های مختلف بر مدت زمان تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده علوم کشاورزی منابع طبیعی گرگان، صفحات ۱۳۲ تا ۱٤۲,

٦-لرستانی، ر.، احمدی، م.ر.، و کلباسی، م.ر.، ۱۳۸۵. اثر سن مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بر مدت زمان تحرک اسپرم، میزان اسپرماتوکریت و چشم‌زدگی. مجله علمی شیلات ایران، صفحات ۱۱۹-۱۲۸,

۷-لرستانی، ر.، احمدی، م.ر.، و کلباسی، م.ر.، ۱۳۸٦. بررسی همبستگی خصوصیات کیفی اسپرم (اسپرماتوکریت و مدت زمان تحرک) سن‌های متفاوت مولدین نر با میزان باروری و چشم‌زدگی تخمک‌ها در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله منابع طبیعی ایران، دانشکده منابع طبیعی تهران، صفحات ١٤١ تا ١٥٠.

۸-لرستانی، ر.، احمدی، م.ر.، و کلباسی، م.ر.، ۱۳۸۲؛ تاثیر محلول‌های فعال‌کننده بر افزایش میزان لقاح در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مجله علوم دریایی ایران، دانشگاه تربیت مدرس، صفحات ٦٧-٧٣.

۹-لرستانی، ر.، احمدی م.ر.، کلباسی، م.ر.، ۱۳۸۳. اثر سن مولد نر و محلول‌های تقویت‌کننده اسپرم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشگاه تربیت مدرس. ٦٤ ص.

۱۰-لرستانی، ر.، ۱۳۸۳. اثر محلول‌های متفاوت تقویت‌کننده اسپرم و میزان اسپرماتوکریت بر روند تکثیر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، سمینار کارشناسی‌ارشد، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس، ٦٠ صفحه.

۱۱-یگانه، س.، ۱۳۸۱. اثر تقویت‌کننده‌ها بر روی مدت تحرک اسپرم و توان لقاح در کفال خاکستری *Mugil cephalus*، پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، کرج: دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۱۱۲ص.

12.Aas, G.H., Refstie, T. and Gjerde, B., 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. Aquaculture 95, 125-132.

13.Alavi, S. M. H. and Cosson, J., 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. Cell Biology International 29, 101-110.

14.Alavi, S.M.H. and Cosson, J., 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. Cell Biology International 30, 1-14.

15.Baynes, S.W., Scott, A.P. and Dawson, A.P., 1981. Rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, Spermatozoa: Effect of pH on motility. J. Fish Biol. 19, 259-267.

16. Billard, R., Petit, J., Jalabert, B. and Szoilosi, D., 1974. Artificial insemination in trout using a sperm diluents. Pages 715-723 in J.H.S. Blaxter, editor. Early life history of fish. Springer-Verlag, Berlin.
17. Billard, R. 1983. Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the rainbow trout, *Salmo gairdneri* J. Repro. Fert. 68, 77-84.
18. Billard, R. and Cosson, M.P., 1986. Sperm motility in rainbow trout, *Parasalmo gairdneri*; Effects of pH and temperature In: Reproduction in fish basic and applied aspects in endocrinology and genetics. Breton B. and Zohar Y., (eds). INRA, Paris, pp.161-167.
19. Billard, R., 1990. culture of salmonids in fresh water. Aquaculture, (2): 549-592.
20. Billard, R., 1992. Reproduction in rainbow trout: Sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. Aquaculture 100, 263-298.
21. Billard, R. and Cosson, M.P., 1989. Measurement of sperm motility in trout and carp. Aquaculture, a biotechnology in progress. N. Depaun, E. Jaspers, Ackefors H. and Wilkins, N. (Eds). European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, pp: 499-503.
22. Billard, R. and Cosson., M.P., 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. J. of Experimental Zoology 261, 122-131.
23. Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W. and Suquet, M., 1995. Sperm physiology and quality. In: Bromage, N., Roberts, R. (Eds), Brood stock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell, Oxford, pp. 25-52.
24. Bromage, N.R. Cumaranataunga, 1988. Egg production in the rainbow trout, In Recent advances in Aquaculture, vol: 39 Muir, J.F, R.J., Robert, Eds, pp. 63-139.
25. Cosson, J., Billard, R., Gibert, C., Dreanno, C., and Suquet, M. 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In the male gamete. From basic to clinical application, C. Gagnon, (Ed). Cache Rive Press. 161-186.
26. Dettlaf, T.A., Ginsburg, A.S., Schmalhausen. 1993. Sturgeon fishes. Springer Velog Berlin.
27. Hines, R.and Yashonv, A. (1971). Some environmental factors influencing the activity of spermatozoa of *Mugil cephalus* cuvier, a gray mullet. Aquaculture 3; 123-127.
28. Liley, N.R. Tamkee, P., Tsai, R. and Hoysak, D.J., 2002. Fertilization dynamics in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)*: Effect of male age, social experience, and sperm concentration and motility on *invitro* fertilization. Can.J. Fish. Aquat. Sci 59: 144-152.
29. Linhart, O., Slechta, V. and Slavik, T., 1991. Fish sperm composition and biochemistry. Bulletin of Institute of Zoology. Academia Sinica. Monograph 16: 258-311.
30. Moccia, R.D. and Munkittrick, K.R., 1986. Relationship between the fertilization of rainbow trout *(Salmo gairdeneri)* eggs and the motility of spermatozoa. Theriogenology 27 (4): 679-688.
31. Nomura, M. 1964. Studies on reproduction of rainbow trout *Salmo gairdnerii* with special reference to egg taking- VI. The activities of spermatozoa in different diluents and preservation of semen. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish 30, 723-733.
32. Ottesen, O.H. and Babiak, I. 2007. Parental effects on fertilization and hatching success and development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) embryos and larvae. Theriogenology 68, 1219–1227.
33. Rakitin, A., Ferguson, M. and Trippel, E., 1999. Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic Cod *(Gadus morhua)*: Correlation and variation during the spawning season. Aquiculture 170, 349-358.
34. Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F. and Nash, J.P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture 234, 1-28.
35. Scott, A.P. and Baynes, S.M., 1980. A review of the biology, handling and storage of Salmonid spermatozoa. J. Fish Biol 17, 707-739.
36. Stoss, J., 1983. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson (Editors), Fish Physiology, Vol. IXB., Academic press, London, PP. 305-350.
37. Tvedt, H.B., Benfey, T.J., Martin-Robichaud, D.J. and Power, J., 2001. The relationship between spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. Aquculture 191, 191-200.

38. Vladi, T.V., Afzelius, B.A. and Bronnikov, G.E., 2002. Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories. Biology of Reproduction 66: 98-105.
39. Yaron, Z. 1995. Endocrine control of gamesomeness and spawning induction in the carp. Aquaculture 129: 49-73.

New Technologies in Aquaculture Development, Islamic Azad University, Azadshahr Branch
Vol. 12, No. 1, Spring 2018

Effect of Sperm Activating Solution on Improvement of Reproduction Efficiency of Rainbow Trout *(Oncorhynchus mykiss)*

[*]S.Sh. Hosseini[1], H. Khara[1] and M.R. Kalbassi[2]
[1]Member of Young Researches club, Dept. of Fishery and Aquaculture, Faculty of Natural Resource, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijanm Iran,
[2]Tarbiat Modarres University, Faculty of Natural Resource, Dept. of Fisheries, Noor, Iran

Abstract

This research has been conducted at the end of propagation season (April) at the Salmonid reproduction and conservation center of Shahid Bahonar–Kelardasht in late 2008. For this order the effect of 4 different saline activator solutions on fertilization rate, eyed eggs and hatching stage were investigated in comparison to water in the reproduction center. After preparing different diluents, 15 males and 10 females were striped. For the measurement of sperm motility, we used light microscope and this period was measured until 95-99% of the sperm cells did not have any mobility. There were significant differences at levels of 95% among different saline activator solutions with the water of propagation center on sperm motility, fertilization, eyed eggs and hatching stage. Results showed that using activator solution with component of NaCl, 7/305 gr/L; CaCl2.2H2O, 0/735 gr/L; pH: 7/7 had the highest fertilization (61.22±3.26%), eyed eggs (57.48±3%) and hatching stage (95.18±0.57%). The noel groups had the lowest fertilization, eyed eggs and hatching stage in comparison of others group.

Keywords: Sperm; Motility; Activator; *Oncorhynchus mykiss*; Kelardasht