

اثر تغییرات بیوشیمیایی اسپرم، روی کارایی تکثیر مصنوعی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)

نسیم جدیدی^۱ و *حسین خارا^۲

^۱باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران،

^۲گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران،

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۸/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۱

چکیده

ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، اصلی‌ترین گونه از ماهیان سردآبی پرورشی در ایران می‌باشد که هر ساله در مراکز مختلف تکثیر، اقدام به تکثیر مصنوعی آن می‌نمایند. در روند تکثیر، عوامل متفاوتی نظیر تخمک‌های استحصالی مولدین ماده، کیفیت و کمیت اسپرم مولدین نر، ترکیبات یونی و بیوشیمیایی موجود در پلاسمای اسپرم مطرح خواهند بود. در این پژوهش، برخی از ترکیبات بیوشیمیایی اسپرم مولدین نر ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و روابط آنها با کارایی تکثیر مصنوعی، مورد بررسی قرار گرفت. در ۱۵ نمونه از مولدین نر که ۵ قطعه ۳ ساله، ۵ قطعه ۴ ساله و ۵ قطعه ۵ ساله بودند، میانگین و انحراف معیار ترکیبات بیوشیمیایی در ماهیان ۳، ۴ و ۵ ساله مورد بررسی قرار گرفت. آلبومین، آلکالین فسفاتاز، اوره، تری گلیسیرید و کلسترول با عوامل کارایی تکثیر ارتباط مستقیم دارند و کراتینین با عوامل کارایی تکثیر رابطه عکس دارد. پروتئین کل با درصد لقاح، رابطه عکس داشته، ولی با درصد چشم‌زدگی، درصد تفریح، درصد بازماندگی لارو رابطه مثبت و مستقیم محاسبه شد. در حالی که ارتباط گلوکز با درصد لقاح، مثبت، اما با درصد چشم‌زدگی، درصد تفریح و درصد بازماندگی لارو منفی و عکس بود.

واژه‌های کلیدی: ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، پارامترهای بیوشیمیایی، تکثیر مصنوعی، مایع اسپرمی

مقدمه

آزاد ماهیان از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی ماهیان در سراسر دنیا می‌باشند. از میان این خانواده، ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از اهمیت و ارزش زیادی برخوردار می‌باشد. تکثیر مصنوعی در ماهیان با هدف بالا بردن درصد لقاح، مراقبت و نگهداری تخم و لارو در برابر دشمنان خارجی، فراهم آوردن بسترهای مناسب تخم‌ریزی در شرایط مصنوعی، حفظ و بقای گونه‌های در حال انقراض و تولید جمعیت بیشتر صورت می‌گیرد

(زادمجید و ایمانپور، ۱۳۸۶). در این میان کیفیت اسپرم از فاکتورهایی است که می‌تواند میزان لقاح را تحت تاثیر قرار دهد و می‌توان از آن به عنوان عامل باروری تخمک‌ها نام برد (Gage et al., 1995; Stockley et al., 1997).

زاد مجید و ایمانپور (۱۳۸۶) در تحقیقی که بر روی ماهی سیم *Abramis brama* انجام دادند به این نتیجه دست یافتند که هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری بین ترکیبات یونی و آلی با تحرک اسپرم مشاهده نشد اما ارتباط معنی‌داری بین میزان گلوکز و اسپرماتوکریت وجود داشت. مقادیر بالای گلوکز تاثیر منفی روی

*نویسنده مکاتبه: h.khara1974@yahoo.com

مواد و روش کار

این تحقیق در فصل تکثیر ۱۳۸۹ در مرکز تکثیر و پرورش ماهی قزل آلی مهندس رضایی، واقع در شهرستان ارومیه، انجام شد. ۱۵ عدد مولد نر ۳، ۴ و ۵ ساله و ۳ مولد ماده بصورت تصادفی از جمعیت مولدین انتخاب شدند. در این پژوهش ترکیبات بیوشیمیایی اسپرم مولدین ماهی قزل آلی رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت. نحوه‌ی اسپرم‌گیری به این صورت بود که پس از انتخاب مولدین نر ۳، ۴ و ۵ ساله و بیهوش کردن آنها با MS222 ناحیه سوراخ تناسلی آنها خشک گردید سپس با فشار آرام به ناحیه شکمی مایع اسپرمی بدون مخلوط شدن با ادرار و فضولات در اپندروف جمع‌آوری و مقداری از اسپرم نیز به تشت‌های حاوی تخمک برای انجام لقاح اضافه شد سپس اپندروف‌های حاوی اسپرم در داخل یخ قرار داده شد و برای بررسی ترکیبات بیوشیمیایی به آزمایشگاه انتقال داده شد (Secer et al., 2004). در آزمایشگاه برای اندازه‌گیری آلبومین به روش بروموکروزول گرین، کراتینین، به روش کلیرنس کراتینین، اوره از دستگاه اتوانالایزر (Technicon) و به روش photometric استفاده گردید. همچنین برای اندازه‌گیری پروتئین کل، گلوکز، کلسترول و تری گلیسیرید از دستگاه اتوانالایزر و به روش Colorimetric استفاده گردید. همچنین برای اندازه‌گیری آلکالین فسفاتاز از دستگاه اتوانالایزر و به روش Enzymatic استفاده گردید. بررسی کارایی تکثیر مصنوعی نیز با توجه به زمان‌های مشخص در کارگاه انجام شد. درصد لقاح حدود یک هفته پس از لقاح و با شفاف‌سازی تعداد مشخصی تخمک (۵۰-۸۰ عدد) و شمارش نمونه‌های دارای کمر بند عصبی

مقادیر اسپرماتوکریت دارد که خود این عامل می‌تواند تاثیر منفی بر روی کارایی تکثیر داشته باشد. آگاهی از دانش جدید در گرایش‌های مختلف زیست‌شناسی اسپرم (Billard et al., 1995). فاکتور مهمی در کنترل روش‌های لقاح مصنوعی در ماهی و گونه‌های در حال انقراض تلقی می‌شود (علوی، ۱۳۸۱).

Secer و همکاران (۲۰۰۴) ارتباط بین پارامترهای بیوشیمیایی و اسپرماتولوژیکی را در منی ماهی قزل‌آلی رنگین‌کمان بررسی نمودند. در این بررسی دلیل میزان بالای یون پتاسیم را در پلاسمای منی، نقش آن در نگهداری اسپرماتوزوآ به صورت ساکن و میزان بالای یون سدیم را در بقاء اسپرم دانست. Lahnsteiner و همکاران (۱۹۹۸) همبستگی مثبتی بین قدرت باروری با میزان تحرک و همچنین با چربی کل، تری گلیسرید، گلیسرول و کلسیم مشاهده نمودند.

Billard و همکاران (۱۹۹۵) بیولوژی اسپرم و تکثیر مصنوعی را در کپور معمولی بررسی نموده و میزان مواد آلی و غیر آلی را در پلاسمای منی کپور تعیین نمودند. Alavi (۲۰۰۳) ترکیبات شیمیایی و اسمولاریته منی و ارتباط فیزیولوژیکی آنها با تحرک اسپرم در تاس ماهی ایرانی بررسی نمود. Alavi (۲۰۰۳) ترکیبات شیمیایی و اسمولاریته مایع سمینال تاس ماهی ایرانی را از لحاظ تاثیری که روی حرکت اسپرم دارند را مورد بررسی قرار داد.

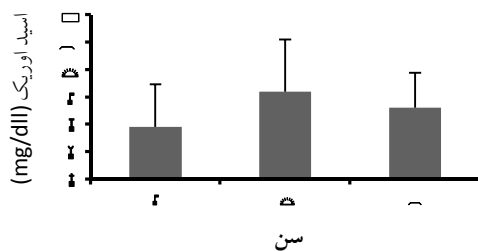
فشار اسمزی، میزان پتاسیم و ساکارز و پلاسمای سمینال با pH کمتر از ۷، فاکتورهای عمده ممانعت کننده حرکت اسپرم در آزاد ماهیان و فشار اسمزی عامل کنترل کننده اصلی حرکت اسپرم در کپورماهیان است (Morisawa و همکاران، ۱۹۸۳).

بر اساس بررسی‌های انجام شده و نتایج بدست آمده از مولدین قزل آرای رنگین کمان، پارامتر درصد چشم‌زدگی فاقد اختلاف معنی‌دار بین مولدین نر ۳ ساله، ۴ ساله و ۵ ساله است ($P > 0/05$). در حالی که ۳ پارامتر درصد لقاح، درصد تفریح، درصد بازماندگی لارو، دارای اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های سنی مختلف می‌باشد ($P < 0/05$). در پژوهش حاضر هیچ کدام از پارامترهای بیوشیمیایی اسپرم با سن مولدین (۳، ۴ و ۵ ساله) اختلاف معنی‌دار آماری نداشتند ($P > 0/05$). ارتباط آل‌بومین، آلکالین فسفاتاز، اوره، تری گلیسرید و کلسترول با عوامل کارایی تکثیر (درصد لقاح، درصد چشم‌زدگی، درصد تفریح، درصد بازماندگی لارو)، مستقیم، و رابطه کراتینین با عوامل کارایی تکثیر، منفی بدست آمد. رابطه پروتئین کل با درصد لقاح، منفی، ولی با درصد چشم‌زدگی، درصد تفریح، درصد بازماندگی لارو مثبت و مستقیم محاسبه شد. در حالی که ارتباط گلوکز با درصد لقاح، مثبت، اما با درصد چشم‌زدگی، درصد تفریح و درصد بازماندگی لارو منفی و عکس بدست آمد.

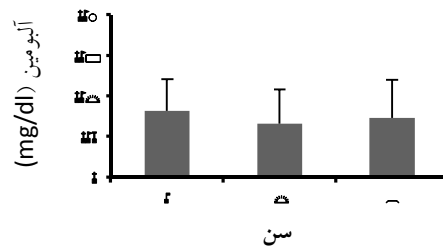
ثبت شد. درصد چشم‌زدگی دو هفته پس از لقاح، درصد تفریح حدود یک ماه پس از لقاح و درصد بازماندگی لارو بعد از اینکه اکثر لاروها دو سوم کیسه زرده خود را جذب کرده و به روی آب آمدند، بر اساس سن مولدین مورد استفاده و تکرارهای مربوط ثبت گردید. جهت مقایسه هر یک از فاکتورهای اندازه‌گیری شده بین گروه‌های مختلف سنی ماهیان از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و زمانی که توزیع داده‌ها نرمال نبود، جهت بررسی هر یک از فاکتورها بین گروه‌های مختلف سنی از آزمون ناپارامتریک کروسکال - والیس در سطح اطمینان ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

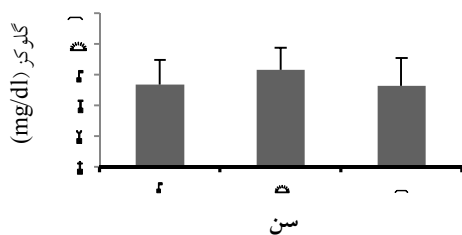
بررسی اثر ترکیبات بیوشیمیایی اسپرم بر روی کارایی تکثیر مصنوعی ماهی قزل آرای رنگین کمان، نیازمند بررسی دقیق کیفیت اسپرم استحصالی از مولدین نر می‌باشد؛ و کاربرد گامت‌هایی با کیفیت بالا از مولدین پرورشی اهمیت زیادی در اطمینان از تولید لاروهای بهتر دارد (Kjorsviketal et al., 1990).



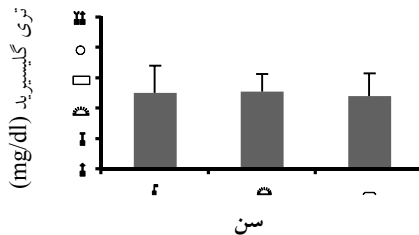
شکل ۲- میانگین اسید اوریک در گروه‌های سنی مختلف



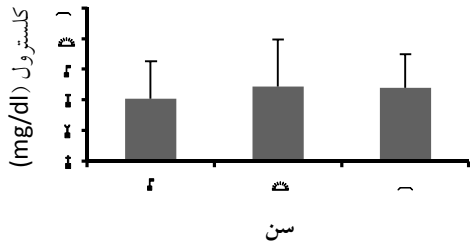
شکل ۱- میانگین فاکتور آل‌بومین در گروه‌های سنی مختلف



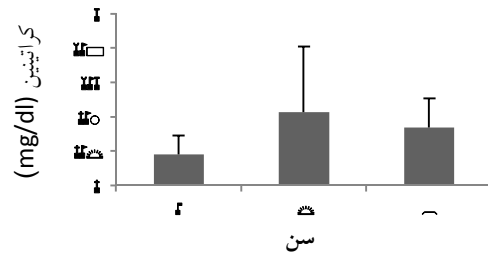
شکل ۴- میانگین فاکتور تری گلیسرید در گروه‌های سنی مختلف



شکل ۳- میانگین فاکتور گلوکز در گروه‌های سنی مختلف

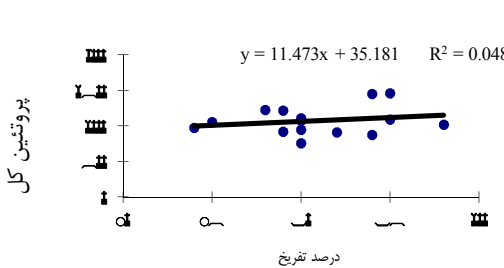
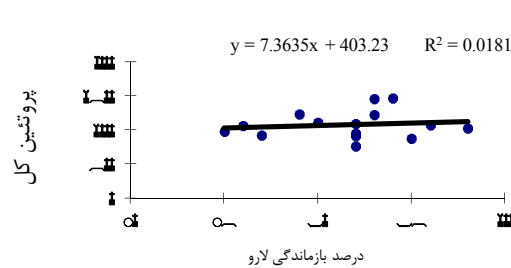
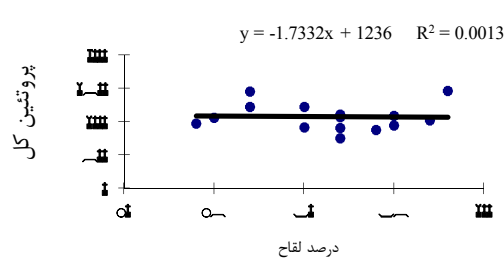
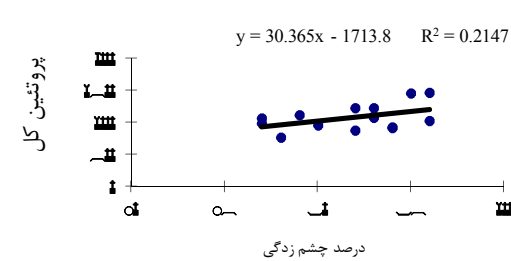
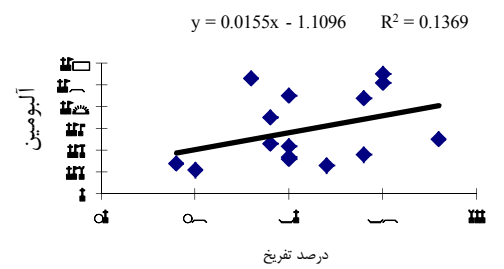
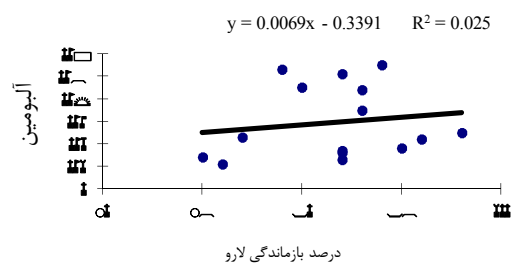
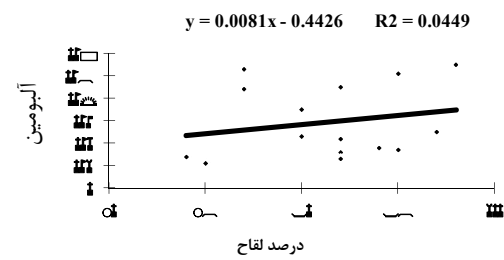
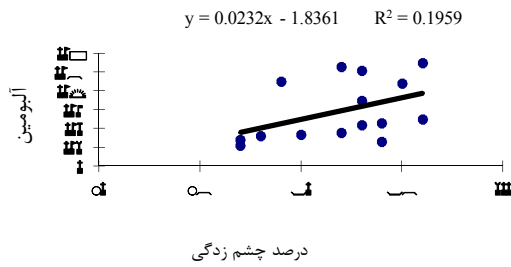


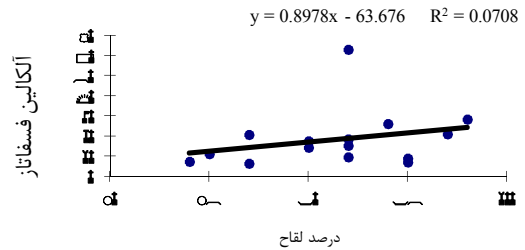
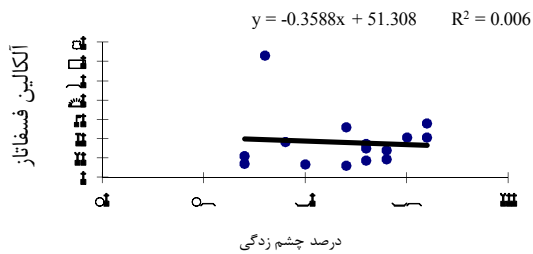
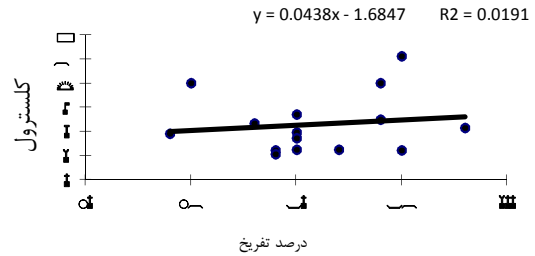
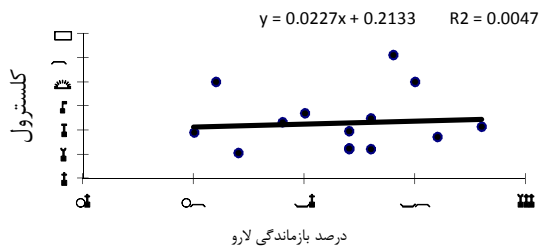
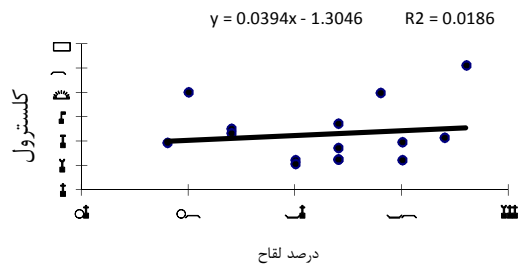
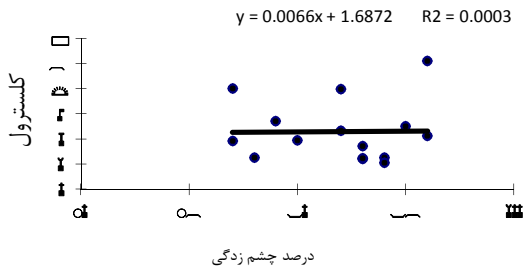
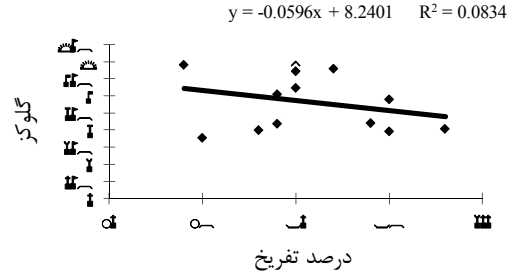
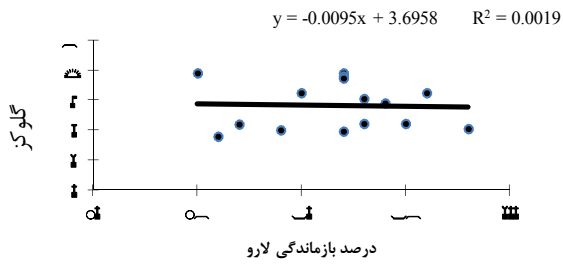
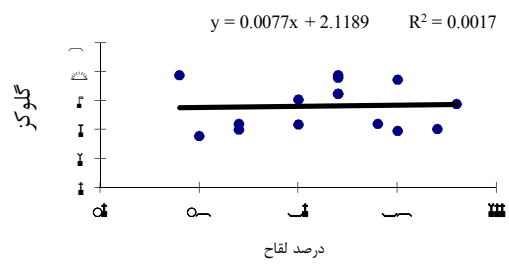
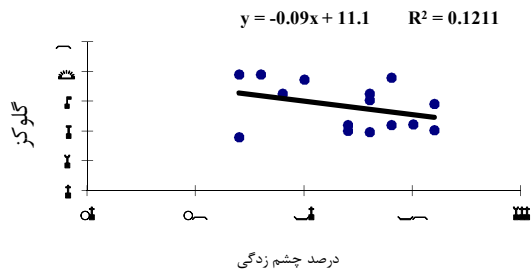
شکل ۶- میانگین فاکتور کلسترول در گروه‌های سنی مختلف

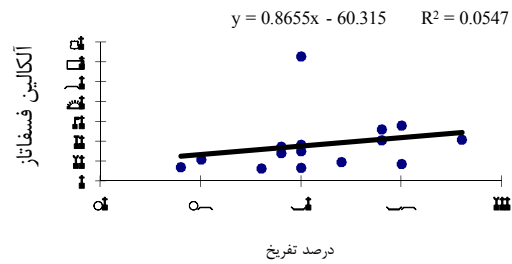
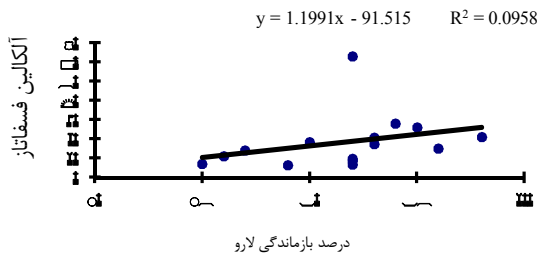


شکل ۵- میانگین فاکتور کراتینین در گروه‌های سنی مختلف

رابطه رگرسیونی برخی ترکیبات بیوشیمیایی با عوامل کارایی تکثیر مصنوعی







بحث

بررسی اثر ترکیبات بیوشیمیایی اسپرم بر روی کارایی تکثیر مصنوعی ماهی قزل آلابی رنگین کمان، نیازمند بررسی دقیق کیفیت اسپرم استحصالی از مولدین نر می‌باشد؛ و کاربرد گامت‌هایی با کیفیت بالا از مولدین پرورشی اهمیت زیادی در اطمینان از تولید لاروهای بهتر دارد (Kjorsviketal et al., 1990).

متاجی (۱۳۸۹) در تحقیقی روی ماهی آزاد دریای خزر، رابطه بین آلکالین فسفاتاز و اسپرماتوکریت را مثبت ارزیابی نمود. اما ارتباط بین آلکالین فسفاتاز و درصد (لقاح، چشم‌زدگی و تفریح) منفی و عکس گزارش کرد.

زحمتکش (۱۳۸۹) بیشترین میزان آلکالین فسفاتاز را در اسپرم مولدین ۳ ساله و کمترین آن را در مولدین ۴ ساله ماهی کپور سرگنده بدست آورد. در تحقیق حاضر بیشترین میزان آلکالین فسفاتاز در اسپرم مولدین ۳ ساله کمترین مقدار در اسپرم مولدین ۵ ساله بدست آمد.

مقدار گلوکز موجود در مایع اسپرمی قزل‌آلابی رنگین‌کمان ۳ ساله، ۴ ساله و ۵ ساله، کمتر از گلوکز موجود در مایع اسپرمی فیل ماهی، $20/61 \pm 7/04$ (باغفلکی و همکاران، ۱۳۸۷)، شیپ $5/16 \pm 2/15$ (شالویی و همکاران، ۱۳۸۶)، ماهی سیم $38/11 \pm 8/09$ (زادمجید و همکاران، ۱۳۸۶) و گلوکز مربوط به مایع اسپرمی ماهی آزاد پرورشی $86/14 \pm 16/14$ (متاجی ۱۳۸۹) می‌باشد. در تحقیق حاضر، میزان گلوکز در

اسپرم ماهیان مولد ۴ ساله بیشتر از ماهیان ۵ ساله بدست آمد. همچنین، زحمتکش (۱۳۸۹) بیشترین میزان گلوکز را در اسپرم مولدین ۳ ساله کپور سرگنده و کمترین میزان اسپرم را در ماهیان مولد ۴ ساله بدست آورد. میزان گلوکز با سن مولدین ارتباط دارد. هرچه سن مولدین کوچکتر باشد، میزان گلوکز بیشتر است. زیرا هرچه ماهی کوچکتر باشد تحرک بیشتری داشت. در نتیجه میزان سوخت و ساز آن بیشتر است و چون گلوکز مهم‌ترین عامل سوخت و ساز است بنابراین میزان آن در ماهیان کوچکتر بیشتر می‌باشد.

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که همواره ارتباط پروتئین کل و کلسترول، با پارامترهای درصد لقاح، درصد چشم‌زدگی، درصد تفریح و درصد بازماندگی لارو ارتباط مستقیم و مثبت است. زادمجید و همکاران (۱۳۸۶) بین عوامل بیوشیمیایی نظیر پروتئین کل، کلسترول و همچنین یون‌ها با یکدیگر و عوامل اسپرم شناختی در ماهی سیم ارتباط معنی‌داری مشاهده نکردند. کلسترول ممکن است اثر حفاظتی در برابر تغییرات محیطی (بخصوص درجه حرارت) زمانی‌که حجم سمن افزایش می‌یابد داشته باشد (Secer et al., 2004). در پژوهشی که زادمجید و ایمان پور (۱۳۸۶) برای بررسی رابطه بین پارامترهای بیوشیمیایی و اسپرم شناختی در نطفه ماهی قزل‌آلابی رنگین‌کمان انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که روابط مثبتی بین پتاسیم و پروتئین و کلسیم و پروتئین ($P < 0/05$, $r = 0/728$)

درصد اسپرماتوکریت کاسته می‌شود. همچنین نتایج نشان دادند که بین آلکالین فسفاتاز و درصد (لقاح، تفریح، بازماندگی لارو) رابطه مثبت برقرار است و با افزایش آلکالین فسفاتاز، بر مقادیر درصد (لقاح، تفریح و بازماندگی لارو) افزوده می‌شود. اما بین آلکالین فسفاتاز و درصد چشم‌زدگی، رابطه منفی و عکس، برقرار است. بدین معنی که با افزایش آلکالین فسفاتاز، از مقدار درصد چشم‌زدگی کاسته می‌شود.

سپاسگزاری

از مجموعه پرسنل محترم اداره کل شیلات استان آذربایجان غربی و مرکز تکثیر و پرورش ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان مهندس رضایی و کلیه عزیزانی که در فراهم ساختن شرایط لازم برای انجام این پروژه ما را همیاری نمودند، صمیمانه سپاسگزاریم.

($P < 0.05$, $r = 0.685$) وجود داشت. ارتباط بین تری-گلیسیرید و اوره با پارامترهای کارایی تکثیر مانند درصد لقاح، درصد چشم‌زدگی، درصد تفریح و درصد بازماندگی لارو مثبت و مستقیم به‌دست آمد. همچنین ارتباط تری گلیسیرید و اوره با سن مولدین دارای اختلاف معنی‌دار آماری نمی‌باشد. در بررسی رابطه بین پارامترهای بیوشیمیایی و اسپرم‌شناختی در نطفه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، رابطه مثبتی بین سدیم و تری گلیسیرید ($P < 0.05$, $r = 0.632$) وجود دارد. همچنین روابط منفی حائز اهمیت بین تری گلیسیرید و اوره ($P < 0.05$, $r = 0.716$) مشاهده کردند (Secer et al., 2004).

بر اساس نتایج بدست آمده و همچنین بر اساس رابطه رگرسیونی بین آلکالین فسفاتاز و اسپرماتوکریت، مشخص شد که ارتباط منفی بین این دو وجود دارد و با افزایش آلکالین فسفاتاز از مقدار

منابع

۱. زادمجید، و. و ایمانپور، م. ۱۳۸۶. ارتباط بین برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی و اسپرم‌شناختی در منی ماهی سیم. مجله علوم و فنون دریایی، دوره ششم، شماره ۱ و ۲، صفحات ۵۷-۶۳.
۲. زحمتکش، م. ۱۳۸۹. اثر سن مولدین در کارایی تکثیر و توان تولیدمثلی ماهی کپور سرگنده (*Aristichthys nobilis*). پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد گرایش شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. ۸۳ صفحه.
۳. متاجی، ع.ا. ۱۳۸۹. اثر ترکیب یونی و بیوشیمیایی اسپرم بر کارایی تکثیر مصنوعی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*). پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد گرایش شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. ۱۲۷ ص.
4. Alavi, S.M.H. 2003. Comparative study on mortality and fertilizing ability of *Acipenser persicus* spermatozoa between freshwater and saline solutions. M.Sc. Thesis, University of Tehran, 105 p.
5. Billard, R., and Cosson, M.P. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in fresh water fish. J. of Experimental Zoology, 261:122-131.
6. Billard, R. Cosson, J., Perchee, G., and Linhart. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in Carp. Aquaculture, 124: 95-112.
7. Gage, F.H., Coates, P.W., Palmer, T.D., Kuhn, H.G., Fisher, L.J., Suhonen, J.O., Peterson, D.A., Suhr, S.T., and Ray, J. 1995. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. Proc. Natural. Acad. Sci. USA, 92: 1187-11883.
8. Kjorsvik, E.; Mangor-Jensen, A., and Holmeffjord, I. 1990. Egg quality in fishes. Advances in Marine Biology. 26: 71-113.

9. Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., and Patzner, R.A. 1998. Determination of semen quality of the rainbow trout by sperm motility, seminal plasma parameters and spermatozoa metabolism. *Aquaculture*, 163: 163-181.
10. Morisawa, M., and Suzuki, K. 1980. Osmolality and potassium ions: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*, 210: 1145-1147.
11. 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.
12. Secer, S., Tekin, N., Bozkurt, Y., Bukan, N., and Akcay, E. 2004. Correlation between biochemical and spermatological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *The Israeli of Aquaculture- Bamidgeh*, 56(4):274-280.

Effect of Biochemical changes in sperm on artificial reproduction performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)

N. Jadidi¹ and *H. Khara²

¹Young Researchers and Elite Club, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

²Department of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

Abstract

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), is the one of the main species of cool water fishes in Iran that each year in different centers of reproduction, have the artificial reproduction. In procedure of reproduction, different factors such as extraction of selected females breeding stocks eggs, the sperm quantity and quality of male breeding stocks, the biochemical and ion composition of sperm from male breeding stocks rainbow trout and their relations with the efficiency of artificial reproduction, were investigated. In 15 samples from male breeding stocks so that 5 pieces of 3 years, 5 pieces of 4 years and 5 had a 5-year. Mean and standard deviation of biochemical compounds in fish 3, 4 and 5 years were investigated. Relationship between albumin, alkaline phosphatase, urea, triglycerides and cholesterol, with multiplication factors of efficiency, were direct, and between creatinine with the efficiency of amplification, was negative. Relationship between total protein with fertilization rate, was negative, but with percentage of protrusion of the eyes, the percentage of hatching, larval survival rate were positive and direct. While relationship between glucose with the percentage of fertilization, was positive, but with percentage of protrusion of the eyes, the percentage of hatching and larval survival were negative.

Keywords: Rainbow trout, Biochemical parameters, Artificial breeding, Semen fluid

*Corresponding author; h.khara1974@yahoo.com