اثر محلول های فعال کننده اسپرم بر کارایی تکثیر مصنوعی ماهی آزاد پرورشی دریای خزر(*Salmo trutta caspius*)

شقایق رضا خانی[1]*؛ علی صادق پور[1]؛ حسین خارا[1]؛ رضا لرستانی[2]

rezakhani@yahoo.com

۱-دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، صندوق پستی ۱۶۱۶

۲-دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات

تاریخ دریافت : آذر ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش : فروردین ۱۳۹۲

چکیده

کیفیت مناسب اسپرم که مهمترین مشخصه آن تحرک می‌باشد، می‌تواند سبب افزایش لقاح گردد. از آنجایی که کیفیت اسپرم‌ها و تخمک‌ها در طول دوره تکثیر به مرور کاهش می‌یابند و این مسئله سبب پایین آمدن کیفیت کار تکثیر خواهد شد، تحقیق حاضر به منظور افزایش کارایی تولید مثل با استفاده از فعال‌کننده‌ها در اواسط فصل تکثیر انجام گرفت. بدین منظور ۱۴ محلول فعال‌کننده با ترکیبات مختلف مورد آزمایش قرار گرفته و از بین آنها ۷ محلول بر اساس افزایش مدت زمان تحرک اسپرم برای انجام تحقیق حاضر انتخاب شدند. اثر ۷ محلول فعال‌کننده و همچنین آب مقطر و آب کارگاه به عنوان شاهد، بر مدت زمان تحرک اسپرم، میزان لقاح، چشم‌زدگی و تخم گشایی مورد بررسی قرارگرفت. نتایج نشان داد که در مورد فاکتور تحرک اسپرم، محلول‌های فعال‌کننده اسپرم اختلاف معنی‌داری در مقایسه با هم و با گروه شاهد داشتند. بدین صورت که فعال‌کننده ۱ با ترکیب $NaCl$ =۶ gr/L ، $CaCl_2$ $2H_2O$ =۰ /۲ gr/L و $CO(NH_2)_2$ = ۴/۵۰ gr/L با pH = ۷/۶ و فعال‌کننده ۶ با ترکیب $CaCl_2.2H_2O$= ./۷۳۵ gr/L ، NaCl= ۷/۳۰۵gr/L با pH=۷/۷ بالاترین مدت زمان تحرک را سبب گردیدند. اما میزان لقاح، چشم زدگی و تخم گشایی در تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی داری را با گروه شاهد نشان ندادند. نتایج موید آن است که استفاده از محلول‌های فعال‌کننده اسپرم مورد تحقیق، تأثیرات معنی‌دار مثبتی در افزایش مدت زمان تحرک اسپرم ماهی آزاد دریای خزر داشتند و این امر می تواند بر کارایی تکثیر مصنوعی اثر مطلوبی داشته باشد.

کلمات کلیدی : محلول های فعال کننده، *Salmo trutta caspius*، تحرک اسپرم، لقاح.

*نویسنده مسئول

۱.مقدمه

آبزی‌پروری قرن‌هاست که در جوامع مختلف در حال انجام است (۲۲)، اما تنها در چند دهه گذشته صنعتی شده است (۲۴). کاهش نسل ماهیان به دلیل صید بی‌رویه، بشر را به فکر تکثیر و پرورش مصنوعی ماهیان جهت جبران این نقیصه انداخت. از این رو بهبود کیفیت مواد تناسلی مولدین و کنترل تولید مثل، می‌تواند ما را در دستیابی به تقاضای روز افزون و در حال رشد آبزی‌پروری در جهان کمک کند (۱۹). یکی از عوامل مهم در فرآیند لقاح، اسپرم است. بنابراین کیفیت مناسب اسپرم که مهم‌ترین مشخصه آن تحرک می‌باشد، می‌تواند سبب افزایش لقاح گردد (۱۰). آزمایش هایی که در مورد به تاخیر افتادن لقاح گامت ها بعد از فعال سازی صورت گرفته است به وضوح نشان می دهد که میزان لقاح تابع تحرک اسپرم می باشد (۲۳). بطور کلی استفاده از محلول فیزیولوژیک ایزوتونیک مانع تغییرات ساختاری اسپرماتوزوآ می‌گردد. تحقیقات جدید بر روی مواد تناسلی ماهی کپور بخصوص اسپرم نشان داده است که استفاده از فعال‌کننده‌ها مانند محلول نمکی موجب حفظ ساختار تاژک اسپرم شده و در نتیجه زمان حرکت اسپرم افزایش می‌یابد (۱). در مایع منی ماهی قزل‌آلا و خاویاری عدم تحرک اسپرم به علت وجود یون پتاسیم (k^+) می‌باشد (۵،۲۵). مدت زمان تحرک اسپرم، درصد سلول های متحرک و سرعت تحرک اسپرماتوزوآ، با توجه به گونه ماهی، دما، ترکیب رقیق‌کننده و همچنین نسبت رقیق‌سازی متفاوت می‌باشد (۱۵) و غلظت داخلی یون کلسیم همراه با شروع تحرک اسپرم افزایش می‌یابد که این نتیجه جریان یون کلسیم خارجی به داخل سلول‌ها است. افزایش یون کلسیم خارجی می‌تواند تحرک اسپرماتوزوآ را القاء کند (۱۷) پس می‌توان عنوان نمود که کیفیت منی یکی از فاکتورهایی است که می‌تواند درصد لقاح را تحت تأثیر قرار دهد و می‌توان از آن به عنوان توانایی برای باروری تخم‌ها نام برد.

بررسی اثر سن و تعیین تاثیر ترکیب یونی و بیوشیمیائی اسپرم بر روی کارائی تکثیر مصنوعی ماهی آزاد دریای خزرتوسط متاجی در سال ۱۳۸۸بررسی و مطالعه شد.و تاثیر مثبت و معنی داری را در میزان درصد باروری نشان داد.به منظور افزایش کارایی تکثیر رهبر (۱۳۸۸) اثر توان باروری مولدین ماهی آزاد دریای خزر را مورد بررسی قرار داد. همچنین تاثیر محلول های فعال کننده اسپرم بر بهبود کارایی تولید مثل ماهی آزاد وحشی دریای خزر انجام شد (۴). نتایج این تحقیق نشان دادکه فعال کننده ها مدت زمان تحرک اسپرم را افزایش می دهند ولی در بالا بردن میزان درصد لقاح و تخم گشایی تاثیری نداشته و تفاوت معنی داری را با گروه شاهد نشان نمی دهند.

با توجه به این مطلب که کیفیت اسپرم‌ها و تخمک‌ها ی ماهیان پرورشی در مقایسه با وحشی از کیفیت پایین تری برخور دارند وحجم و غلظت و برخی دیگر از فاکتورها ی آنها افت چشم گیری می یابد و این مسئله سبب افت کیفیت تکثیر خواهد شد، واضح است که اجرای این تحقیق می‌تواند گامی در جهت بهبود فرآیند تکثیر و انجام موفق‌تر آن در فصل تولید مثل باشد. در این تحقیق سعی خواهد شد اثر محلول‌های مختلف فعال‌کننده نمکی اسپرم بر میزان درصد لقاح ماهی آزاد پرورشی دریای خزر بررسی شود تا با یافتن فعال‌کننده مناسب برای اسپرم این ماهی ارزشمند که یکی از گونه‌های مهم اقتصادی کشور است، باعث افزایش کارایی لقاح مصنوعی در فصل تکثیر و تولید بیشتر آن در کارگاه های پرورشی شود.

۲. مواد و روش ها

تحقیق حاضر در پاییز سال ۱۳۹۰و در مرکز بازسازی ذخایر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت واقع در غرب استان مازندران انجام شد. جهت آماده سازی محلول‌های فعال‌کننده مختلف، ترکیبات مواد آزمایشگاهی مربوط به هر یک، بر حسب گرم در لیتر به دقت توزین شدند. سپس مواد مربوط به هر فعال‌کننده در بشر جداگانه‌ای ریخته شده و بوسیله دستگاه همزن مغناطیسی،

مواد را در یک لیتر از آب مقطر کاملا حل نموده و سپس نسبت به تنظیم pH بوسیله HCl و NaOH و با استفاده از دستگاه pHمتر در pH مورد نظر اقدام شد.

از میان محلول‌های فعال‌کننده متفاوت، پنج محلول که باعث بیشترین مدت زمان تحرک اسپرم گردید، انتخاب شدند. بدین منظور، اسپرم استحصال شده از ۵ ماهی مولد نر که به یک نسبت در یک پلیت مخلوط شده بود جهت سنجیدن تحرک اسپرم با استفاده از فعال‌کننده‌های مختلف و گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفت (۸). یک قطره اسپرم را روی لام در زیر میکروسکوپ قرار داده و جهت فعال‌سازی آن، یک قطره آب مقطر به عنوان گروه شاهد استفاده شد و همزمان بوسیله کرنومتر مدت زمان تحرک ثبت گردید (۱۱، ۶،۱۰). جهت سنجش اثر فعال‌کننده‌های متفاوت اسپرم بر مدت زمان تحرک اسپرم، همانند گروه شاهد عمل شد با این تفاوت که جهت فعال‌سازی اسپرم به جای آب، از فعال‌کننده‌ها استفاده گردید (۱، ۶،۱۰) و مدت زمان تحرک اسپرم در گروه شاهد و در تمامی فعال‌کننده‌ها در سه تکرار ثبت گردید. ۲ محلول فعال کننده دیگر (محلول های شماره ۳ و ۵) نیز برای تکمیل نتایج بصورت تصادفی انتخاب شدند. در نهایت ۵ فعال‌کننده که باعث بیشترین مدت زمان تحرک شدند، ۲ محلول فعال کننده تصادفی و محلول های شاهد (آب کارگاه، آب مقطر) جهت انجام لقاح‌ها بکار رفتند. بعد از ساخت محلول‌های فعال‌کننده، EC محلول‌ها با استفاده از دستگاه مدل Metrohm/644Conductom-eter ساخت کشور سوئیس محاسبه گردید. pH آنها با استفاده از دستگاه pH متر مدل HANNA 211 ساخت کشور آلمان تعیین شد.

جهت انجام عملیات تکثیر از ۵ ماهی ماده و ۵ ماهی نر استفاده شد. در ابتدا ماهی‌های ماده را بوسیله عصاره گل میخک (۱۵۰ppm) بیهوش نموده و تخمک‌های مورد نیاز جهت لقاح تهیه گردید. پس از بیهوش کردن مولدین نر در ابتدا بطور جداگانه اسپرم‌گیری شدند استحصال اسپرم مستقیماً از سوراخ تناسلی مولدین نر بعد از خشک کردن اطراف سوراخ تناسلی انجام شد. جهت انجام لقاح‌ها، به دلیل 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 (۱۴).

جدول۱:ترکیبات محلول های انتخاب شده جهت انجام لقاح ها بر حسب گرم بر لیتر

مواد / محلول	NaCl	$CaCl_2.2H_2O$	$CO(NH_2)_2$	Tris	Glycine	KCl	$MgSO_4.7H_2O$	$NaHCO_3$	pH
گروه شاهد	آب کارگاه								۷/۷
	آب مقطر								۷
محلول ۱	۶	/۲.	۴/۵۰	–	–	–	–	–	۷/۶
محلول ۲	۵/۵۴	–	–	۲/۴۲۲	–	–	–	–	۸/۴
*محلول ۳	۷/۳۰۵	–	–	۲/۴۲۲	–	–	–	–	۹
محلول ۴	۹/۰۵۸	/۲۶۴.	–	–	۰/۲۳	۰/۲۳	۰/۳۲	–	۹
*محلول ۵	–	–	–	–	–	–	–	۸/۴۰۱	۸
محلول ۶	۷/۳۰۵	۰/۷۳۵	–	–	–	–	–	–	۷/۷
محلول ۱۱	۹	۰/۳	–	–	۰/۲	۰/۲	–	–	۹

* محلول هایی که بصورت تصادفی جهت تکمیل تحقیق انتخاب شدند.

به منظور سنجش تاثیر متقابل فعال‌کننده‌های نمکی بر روی غلظت‌های متفاوت و تحرک‌های متفاوت در اسپرم‌های مولدین مختلف از ۳ گروه با غلظت‌های متفاوت اسپرم استفاده شد. اسپرم‌های مولدین را به ۳ گروه ۵ تایی تقسیم کرده و با هم مخلوط شدند. از ترکیب آنها ۳ پلیت A، B،C تشکیل شد، در هر گروه، مجموعا ۷ تیمار (فعال‌کننده‌های نمکی) و یک گروه شاهد، هر یک با ۳ تکرار در نظر گرفته شد. 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 (۱۴). سپس هر دسته تخمک را جداگانه در ظروف پلاستیکی متوسط قرار داده و برای هر ظرف، ۳/. سی‌سی اسپرم با استفاده از میکروپیپت برداشته شد و با تخمک‌های موجود در آن کاملا مخلوط گردید. به منظور فعال‌سازی اسپرم و انجام عمل لقاح ۳ سی‌سی آب مقطر در تیمار گروه شاهد به هر ظرف اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه کاملا هم زده شد تا لقاح کامل گردد. عمل لقاح در تیمارهای متفاوت فعال‌کننده نمکی دقیقا 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. تخمک‌های لقاح یافته موجود در ظروف پلاستیکی بعد از شستشو، در آبکش‌هایی که قبلا شماره‌گذاری شده بودند قرار گرفته و جهت جذب آب به مدت ۳۰ دقیقه در تراف قرار گرفتند و سپس جهت انکوباسیون، تکرارها بطور تصادفی در انکوباتورهایی که از قبل آماده شده بود، قرار گرفتند.

به منظور سنجش مدت زمان تحرک، در ابتدا اسپرم مولدین نر هر گروه بصورت جداگانه، و سپس مخلوط اسپرم‌های مولدین بصورت گروه های ۵ تایی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای سنجش تاثیر گروه شاهد بر مدت زمان تحرک اسپرم، یک قطره آب مقطر روی لام در زیر میکروسکوپ قرار داده و یک قطره اسپرم با آن مخلوط گردید و مدت زمان تحرک اسپرم بلافاصله با استفاده از کرنومتر ثبت شد. مدت زمان تحرک اسپرم تا زمانی که تحرک ٪۹۵ الی ٪۹۹ میزان اسپرم‌ها متوقف شوند در نظر گرفته شد (۲۳،۱۴،۱۱). طول دوره تحرک موجی اسپرماتوزوئیدها تا پایان تحرک گروهی و موجی شکل آنها در نظر گرفته شد. این سنجش ها برای فعال‌کننده‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۱۱ و گروه شاهد (آب مقطر، آب کارگاه و سرم فیزیولوژی)، حداقل ۳ بار به عنوان ۳ تکرار در هر یک از گروه ها محاسبه و سپس ثبت شد. جهت انجام انکوباسیون تخم‌های لقاح یافته، ۱ تراف و ۳ سینی بکار رفت. هر سینی توسط نئوپلاست به ۱۲ قسمت مساوی تقسیم شد و تمام قسمت‌های تقسیم‌بندی شده سینی‌ها به طور تصادفی شماره گذاری شدند و تخمک های لقاح یافته، پس از جذب آب، بطور کاملا تصادفی بر حسب شماره‌های معین شده، در جایگاه خود در سینی‌ها قرار گرفتند. از ۲ روز بعد از لقاح تا بعد از مشاهده اولین چشم‌زدگی تخم‌ها، تخم‌ها بوسیله مالاشیت‌گرین جهت پیشگیری از قارچ‌زدگی ضدعفونی شدند. میزان مالاشیت گرین مورد استفاده برای هر تراف ۱ گرم در لیتر بود که تخم‌ها یک روز در میان به مدت ۴۵ الی ۶۰ دقیقه در معرض این ماده قرار می‌گرفتند (شرایط معمول کارگاه). برای تعیین درصد لقاح حدود ۱۰۰ عدد تخمک، پس از شفاف‌سازی بوسیله محلول شفاف کننده[1]، مشاهده شده و نمونه‌های دارای کمربند عصبی مورد شمارش قرار گرفتند. میزان لقاح تخمک‌ها مطابق رابطه ۱ محاسبه شده و ثبت گردید.

رابطه ۱ (۱۹) : درصد لقاح =

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

1- clearing solution(Stockard's solution):Formaldehyde5%+Acetic acid4%

میزان بازماندگی تخم‌ها تا مرحله چشم‌زدگی از طریق رابطه ۲ محاسبه و ثبت شد.

رابطه ۲ (۲) : درصد چشم زدگی =

۱۰۰ × (تعداد تخمک‌های لقاح یافته/ تعداد تخم‌های چشم زده)

بعد از جمع‌آوری تلفات در روز چشم‌زدگی، تخم‌های چشم زده پس از شمارش در سینی‌های چشمه درشت قرار گرفتند. با شروع تخم گشایی و خارج شدن لارو و پوسته از چشمه سینی به درون تراف، تخم‌های تفریخ نزده و تلف شده در سینی‌ها باقی ماندند که پس از شمارش آنها میزان تخم گشایی از طریق رابطه ۳ بدست آمده و ثبت گردید.

رابطه ۳ (۸) :

۱۰۰ × (تعداد تخم‌های چشم‌زده/ تعداد لارو) = درصد تفریخ

اطلاعات جمع آوری شده از بررسی‌ها و مطالعات میدانی و آزمایشگاهی با استفاده از نرم افزارهای SPSS 13 و Excel 2003 و به شرح زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در ابتدا نرمال بودن توزیع داده ها با آزمون Shapiro-Wilk's بررسی گردید. زمانیکه توزیع داده ها نرمال بوده جهت مقایسه هر یک از فاکتورهای اندازه گیری شده بین محلول های مختلف از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way-ANOVA)و زمانیکه توزیع داده ها نرمال نبوده جهت بررسی هر یک از فاکتورها بین محلول های مختلف از آزمون ناپارامتریک کروسکال – والیس(Kruskal-Wallis)در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شده است.

جهت مقایسه گروه های های آزمایشی در حالت نرمال از آزمون توکی استفاده گردیده است. از آزمون. T- Test نیز جهت مقایسه گروه ها استفاده شد.

۳. نتایج

میانگین و انحراف معیار طول کل و طول چنگالی ماهیان نر مورد استفاده در این تحقیق به ترتیب ۸/۹۳±۴۳/۸ و ۸/۰۷±۴۱/۲۰ سانتی متر بود. کمترین طول کل و طول چنگالی در ماهیان نر به ترتیب ۳۵ و ۳۳ سانتی متر و بیشترین طول کل و طول چنگالی آنها به ترتیب ۵۶ و ۵۲ سانتی متر بود (جدول۳-۱). همچنین از ماهیان ماده با متوسط طول کل و طول چنگالی به ترتیب ۱۵/۲±۵۲/۴ و ۱۴/۱±۴۸/۸سانتی متر استفاده شد که حداقل و حداکثر آنها به ترتیب ۳۱- ۳۴و ۶۴ - ۶۹ بودند (جدول ۳و۲).

میانگین و انحراف معیار وزن مولدین نر مورد استفاده در تحقیق۰/۶۲۴±۱۱۰۰گرم که حداقل و حداکثر آن به ترتیب ۶۰۰و ۲۰۰۰ گرم بود و در مولدین ماده میانگین و انحراف معیار وزن ۱/۳۲±۱۰۸۸ گرم با حداقل و حداکثر وزن ۴۰۰ و ۳۵۰۰ گرم بودند (جداول ۲و ۳).

با توجه به آزمون t-test : بین ماهیان مولد نر و ماده از نظر طول کل،طول چنگالی و وزن بدن اختلاف معنی دار آماری مشاهده نگردید($P>0/05$).

جدول ۲:زیست سنجی مولدین نر ماهی آزاد (N=5)

فاکتور	حداقل	حداکثر	انحراف معیار ± میانگین
طول کل (سانتی متر)	۳۵	۵۶	۴۳/۸±۸/۹۳
طول چنگالی (سانتی متر)	۳۳	۵۲	۴۱/۲۰±۸/۰۷
وزن (گرم)	۶۰۰	۲۰۰۰	۱۱۰۰± ۰/۶۲۴

جدول ۳:زیست سنجی مولدین ماده ماهی آزاد (N=5)

فاکتور	حداقل	حداکثر	انحراف معیار± میانگین
طول کل (سانتی متر)	۳۴	۶۹	۵۲/۴± ۱۵/۲
طول چنگالی (سانتی متر)	۳۱	۶۴	۴۸/۸±۱۴/۱
وزن (گرم)	۴۰۰	۳۵۰۰	۱۰۸۸± ۱/۳۲

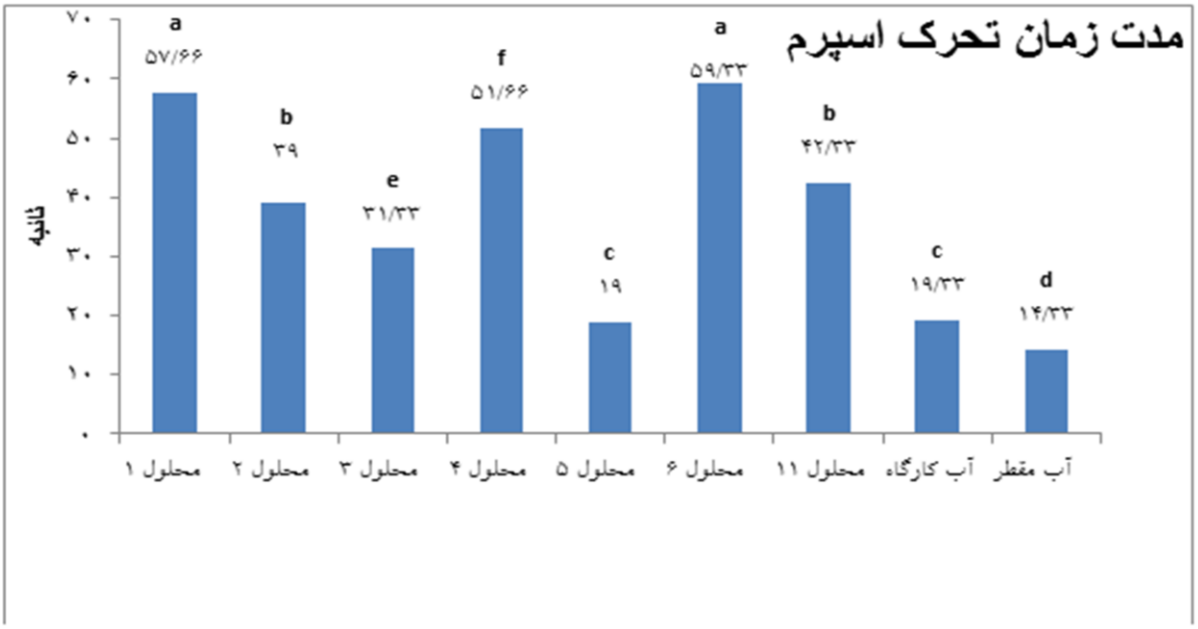
نتایج آزمون ANOVA نشان داد که بین محلول‌های فعال‌کننده مورد بررسی از نظر فاکتور مدت زمان تحرک اسپرم اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید($P<0/05$) ($F=596/19 P,=0/00$) (شکل ۱).

نتایج بدست آمده در مورد مدت زمان تحرک اسپرم در تماس با محلول‌های مورد نظر نشان داد که، محلول فعال‌کننده ۱ (۵۷/۶۶ ثانیه) و ۶ (۵۹/۳۳ ثانیه) اختلاف معنی‌دار آماری با هم نداشته و بالاترین مدت زمان تحرک اسپرم را سبب شدند. فعال‌کننده ۴ (۵۱/۶۶ثانیه) در جایگاه بعدی قرار گرفت. بین فعال‌کننده ۲ (۳۹ ثانیه) و ۱۱ (۴۲/۳۳ ثانیه) هم اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشت($P>0/05$). محلول ۳ (۳۱/۳۳ ثانیه) با سایر محلول های دیگر اختلاف معنی داری را نشان داد ($P>0/05$). گروه شاهد یعنی آب کارگاه ، آب مقطر و محلول ۵ (به ترتیب ۱۴/۳۳،۱۹/۳۳ و ۱۹ثانیه) اختلاف معنی‌داری با فعال‌کننده‌های مطرح شده داشتند و نسبت به آنها تحرک کمتری را دارا بودند. همچنین آب کارگاه (۱۹/۳۳ثانیه) و آب مقطر (۱۴/۳۳ ثانیه) با هم اختلاف معنی دار داشتند.

باتوجه به آزمون کروسکال – والیس انجام گرفته، بین محلول های مورد بررسی از نظر فاکتور درصد لقاح اندازه گیری شده اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($P>0/05$). (شکل ۲).

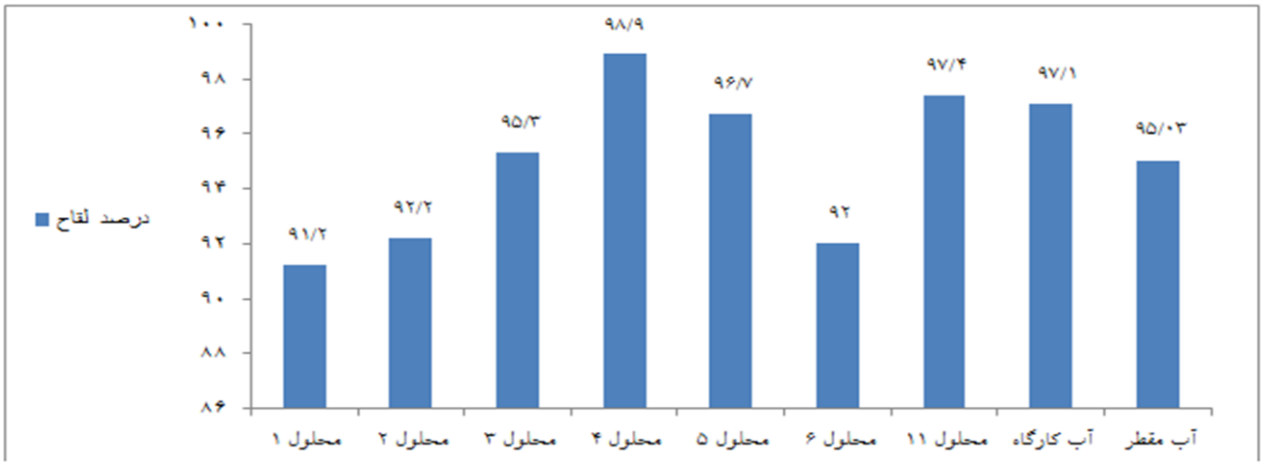
در مورد اثر فعال کننده های مورد بررسی بر میزان چشم زدگی تخم ها نشان داد که بین محلول ها از نظر فاکتور درصد چشم زدگی اندازه گیری شده، اختلاف معنی دار آماری وجود ندارد($P>0/05$).

نتیجه آزمون کروسکال – والیس در مورد اثر فعال کننده های متفاوت بر درصد تخم گشایی نشان داد که بین محلول ها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نگردید($P>0/05$)(شکل۴).



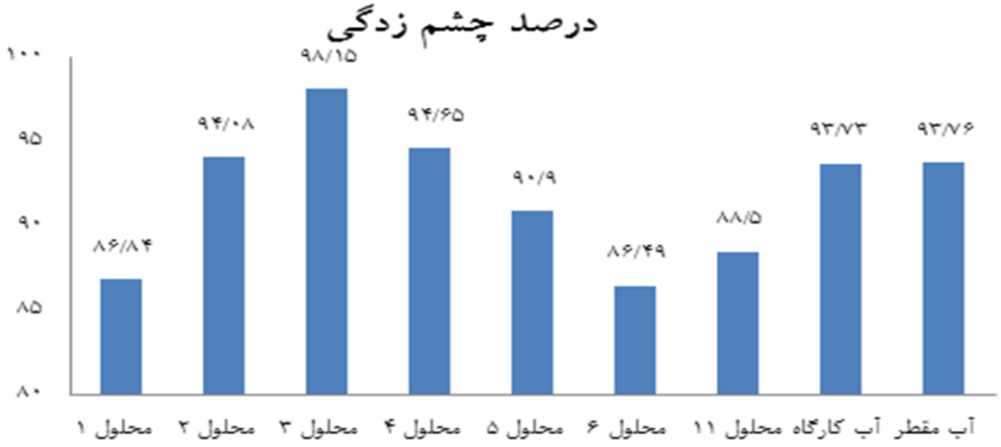
شکل ۱: مدت زمان تحرک اسپرم در حضور هر یک از فعال کننده ها

(Chi-Square = 3.729 df= 9 Sig. = 0.928)



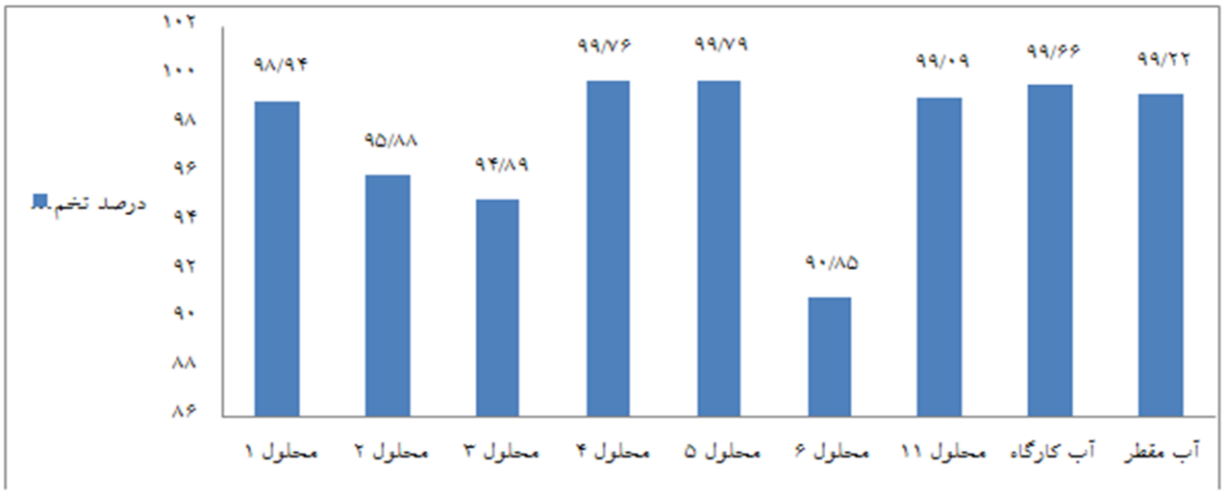
شکل ۲:مقایسه درصد لقاح در حضور هر یک از فعال کننده ها

(F = 1.91 P = 0.121)



شکل۳ : مقایسه درصد چشم زدگی در حضور هر یک از فعال کننده ها

(Chi-Square = 10.59P = 0.22)



شکل ۴:مقایسه درصد تخم گشایی در حضور هر یک از فعال کننده ها

۴. بحث

نتایج نشان داد که تمامی فعال‌کننده‌های نمکی اسپرم، اثر مثبت و معنی‌دار متفاوتی بر طول کل مدت زمان تحرک اسپرم در مولدین نر با گروه شاهد نشان داده‌اند و میزان تحرک بالاتری را سبب گردیدند. این نتیجه در تحقیقات (۵، ۴،۳،۷) مشابه بوده است.

با مقایسه ترکیبات فعال‌کننده‌های متفاوت دیده می‌شود که در بین فعال‌کننده‌های متفاوت اسپرم ارائه شده دو فعال‌کننده ۱ و ۶، سبب بالاترین میزان تحرک در مقایسه با دیگر گروه ها شده‌اند. شاید دلیل این امر این باشد که در این دو فعال‌کننده، برهم‌کنش یون ها، فشار اسمزی، pH و ... محیط مناسبتری را برای سلول‌های اسپرم ماهی آزاد پرورشی دریای خزر در اواسط فصل تکثیر در مقایسه با دیگر فعال‌کننده‌ها، ایجاد کرده باشند. اثر تجمعی یون‌ها منجر شده است که محققان نشان دهند، امکان کنترل تحرک با تغییر پتانسیل غشاء، بوسیله ترکیب تاثیر چندین یون وجود دارد (۲۱).

از طرفی در ترکیب فعال‌کننده ۶، یون کلسیم که یون ضروری جهت آغاز تحرک اسپرماتوزوآ در اسپرم آزاد ماهیان است (۱۸) وجود دارد و این میزان در ترکیب فعال‌کننده ۶، نسبت به فعال‌کننده های دیگر مورد تحقیق، بالاتر می‌باشد. یون کلسیم مهمترین فاکتور جهت القاء و تجدید مدت زمان تحرک اسپرم می‌باشد (۸) .از آنجا که با اضافه نمودن ۱ میلی‌مول کلسیم به محلول‌های فعال‌کننده اسپرم، مدت زمان تحرک اسپرم فراتر از ۳۰ ثانیه به طول می‌انجامد (۱۷) و از طرفی وجود یون های کلسیم و سدیم نیز اثر تقویت‌کنندگی بر مدت زمان تحرک اسپرم دارند (۱۰) پس عملکرد مناسبتر فعال‌کننده‌های ۱و ۶ در مقایسه با گروه شاهد، به دلایل مختلف از قبیل وجود یون‌های متفاوت و مورد نیاز سلول‌های اسپرم جهت تداوم تحرک، ایجاد یک محیط با فشار اسمزی مناسب و قابل توجیه می‌باشد. در تحقیقی استفاده از فعال‌کننده‌ها در لقاح تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus* را مورد بررسی قرار دادند(۱). نتایج آن نشان دادکه محلول‌های فعال‌کننده باعث حفظ ساختار تاژک اسپرم شده و در نتیجه مدت زمان تحرک در مقایسه با آب بالاتر می‌رودو نتایج آن در تحقیق حاضر مشابه بوده است.

در تحقیقی، با بکارگیری محلول فعال‌کننده ۶، در اوایل فصل تکثیر، تاثیر فوق‌العاده محلول ۶ را گزارش کرده بودند (۸).که تحقیق حاضر، علاوه بر تأیید اثر مناسب محلول ۶ بر میزان تحرک اسپرم‌های آخر فصل مولدین نر، محلول ۱ را نیز یک محلول مناسب جهت افزایش تداوم تحرک برای بکارگیری آن در آخر فصل تکثیر، گزارش می‌نماید.

تحرک اسپرم در آزاد ماهیان و کپور ماهیان مورد سنجش قرار گرفت(۱۶). نتایج نشان داد، زمانی که یک میلی‌مول کلسیم به فعال‌کننده NaCl=125g/L، Tris= 20Mm با pH = 9 اضافه شود، مدت زمان تحرک اسپرم فراتر از ۳۰ ثانیه به طول می‌انجامد که با مشاهده تقویت کننده ۶ نیز این امر مشخص و واضح است. همچنین گزارش شده که Ca^{++} جهت واکنش آکروزومی و تحرک اسپرم درتاس ماهی سفید *Acipenser transmontanus* نتایج مثبتی داشته است (۲۰).

تاثیر محلول های فعال کننده اسپرم بر بهبود کارایی تولیدمثل ماهی آزاد وحشی دریای خزر*salmo caspius* انجام شد(۴). نتایج این تحقیق نشان دادکه در بین فعال کننده های متفاوت اسپرم ارایه شده دو فعال کننده ۱و۶ سبب بالاترین میزان تحرک در مقایسه با دیگر گروهها شده اند . که در مورد ماهی آزاد پرورشی دریای خزر نیز بین فعال کننده های متفاوت اسپرم ارایه شده دو فعال کننده ۱و۶ سبب بالاترین میزان تحرک شدند .

همچنین در نمودار۱ اثر فعال‌کننده‌ها بر طول کل مدت زمان تحرک اسپرم، دیده می‌شود که فعال‌سازی اسپرم بوسیله گروه شاهد (آب کارگاه و آب مقطر)، کمترین مدت زمان تحرک را در مقایسه با سایر فعال‌کننده‌ها نشان می‌دهد.

در روش‌های قدیمی لقاح مصنوعی، به جای فعال‌کننده از آب استفاده می‌شد. آب هم برای اسپرماتوزوآ و هم برای تخمک مضر می‌باشد (۱۸). پس با استفاده از فعال‌کننده‌ها مانند محلول نمکی نشان داده شده که محلول‌های فعال‌کننده 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 بدست آمده توسط محققان فوق در رابطه با اثر محلول‌های فعال‌کننده نمکی در مقایسه با آب معمولی می‌باشد زیرا مدت زمان تحرک اسپرم در فعال‌کننده‌های نمکی در مقایسه با آب بیشتر بوده و تفاوت معنی‌داری را با آن نشان می‌دهد. محققان در تحقیق‌های متفاوت، محیط با pH مساوی ۹ را جهت تحرک سلول‌های اسپرماتوزوئید، محیطی مناسب ارزیابی نموده‌اند. در حالیکه در تحقیق حاضر محلول های ۱ و ۶ که بالاترین مدت زمان تحرک اسپرم را سبب گشتند، به ترتیب pH ۷/۶ و ۷/۷ را نشان دادند.

با مقایسه نمودار مربوط در استفاده از فعال‌کننده‌های متفاوت اسپرم، این نکته بدست می‌آید که فعال‌کننده‌های متفاوت در تمامی گروه های مولدین نر، تاثیر تقریبا یکسانی را بر میزان لقاح تخمک‌ها در اواسط فصل تکثیر داشته‌اند و اختلاف معنی‌داری را در میزان لقاح در مقایسه با گروه شاهد خود، نشان ندادند این در حالی است که در تحقیقی روی اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان در اواخر فصل تکثیر تأثیر مثبت فعال کننده های نمکی را در میزان لقاح تخمک ها و تخم گشایی نشان دادند(۳). با این حال در بررسی همبستگی خصوصیات کیفی اسپرم مولدین نر در روند تکثیر قزل آلای رنگین کمان اعلام کردند که همبستگی بین مدت زمان تحرک اسپرم با میزان لقاح و چشم زدگی معنی دار نیست(۷). همچنین بررسی تاثیر محلول های فعال کننده اسپرم بر بهبود کارایی تولیدمثل ماهی آزاد وحشی دریای خزر انجام شد(۴). که نتایج این تحقیق نشان دادکه استفاده از فعال کننده ها در افزایش لقاح تاثیری نداشته و در مورد ماهی آزاد پرورشی دریای خزر که از کیفیت لقاح پایین تری نسبت به وحشی برخوردارند نیز این فعال کننده ها بر افزایش لقاح در اواسط فصل تکثیر تاثیری نداشته است .

بطور کلی می توان اینچنین بیان نمود 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. اما از آنجاییکه میزان تولید اسپرم در ابتدا و انتهای فصل تکثیر پایین بوده و برعکس تولید اسپرم در اواسط فصل تکثیر، بطور ثابت و یکنواخت و به میزان بالاتر و همچنین محدودیت و کاهش تحرک اسپرماتوزوآ در ابتدا و انتهای فصل تکثیر مشاهده شده است (۱۲)، بنابراین می توان اینگونه اذعان کرد که همگی محلول های فعال کننده اسپرم در اواسط دوره تکثیر، لقاح را به حد بالای خود رسانده و حتی در گروه های شاهد شامل آب مقطر، آب کارگاه میزان بالای لقاح در تخمک ها روی داده است.

مدت زمان تحرک اسپرم در حضور گروه شاهد (آب کارگاه) و آب مقطر کمترین مقدار را نشان داد اما پائین بودن طول کل دوره تحرک اسپرم در این گروه، با افزایش غلظت اسپرم در اواسط فصل تکثیر به حدی جبران شده است که این گروه ها نیز در میزان لقاح در بین گروه های دیگر اختلاف معنی داری را نشان ندهند. غلظت اسپرم می‌تواند اثرات کاهش تحرک را در لقاح جبران کند(۱۵). نتایج این گزارش را بوضوح می‌توان در مقایسه گروه‌های متفاوت این تحقیق، درک نمود. با مقایسه نتایج میزان چشم‌زدگی تخمک‌ها، به نظر می رسد که اسپرم های مولدین نر در اواسط دوره تکثیر از بالاترین کیفیت خود برخوردار بوده و اثر محلول های فعال کننده در مقایسه با گروه شاهد، اختلاف معنی داری را بروز نداده است و همچنان این روند نیز با حد قابل قبول و مثبتی ادامه یافته است.

با بررسی نتایج حاصل از تخم گشایی، در اواسط فصل تکثیر، مشاهده می‌شود که همچنان در تمامی فعال‌کننده‌های نمکی، اختلاف معنی‌داری در میزان تخم گشایی در مقایسه با گروه شاهد وجود ندارد. ممکن است این عامل به دلیل ایجاد لقاح پایداری باشد که در نتیجه تحرک مناسبی که این فعال‌کننده ها ایجاد کرده اند حاصل شده باشد که نتیجه آن در میزان بالاتر لقاح، چشم‌زدگی و تخم گشایی تمامی گروه های مورد مطالعه به چشم می‌خورد.با توجه به اینکه اسپرماتوزوآ تنها در یک نقطه یعنی میکروپیل می‌تواند در تخمک نفوذ کند(۱۶). بنابراین طبیعی به نظر می‌رسد که با افزایش تحرک اسپرم، میزان لقاح و در مرحله بعد چشم‌زدگی بالاتر باشد که نتیجه این ارتباط، همبستگی معنی‌دار آنها می‌باشد.

از آنجا که چشم زدگی تخم ها و تخم گشایی تابعی از فرآیند لقاح می باشند، بنابراین اختلاف معنی داری در میزان چشم زدگی و تخم گشایی در حضور محلول های فعال کننده متفاوت دیده نشد.

خصوصیات کمی پلاسمای منی ماهی کفشک اقیانوس اطلس *Hippoglossus hippoglossus* را درطول فصل تکثیر بررسی کردند(۱۳). و نتیجه گرفتندکه افزایش غلظت اسپرم، با پارامترهای کیفی اسپرم از قبیل تحرک اسپرماتوزوآ، درصد سلول‌های متحرک، حرکت موجی شکل و مستقیم اسپرماتوزوآدارای رابطه معنی‌داری بوده، و با افزایش غلظت اسپرم، پارامترهای یاد شده کاهش یافته‌اند. نتایج تحقیق حاضر نیز درارتباط با افزایش دوره تحرک اسپرماتوزوآ با کاهش غلظت اسپرم دراواسط فصل تکثیر، نتایج محققان یاد شده را تأیید می‌نماید. بررسی تاثیر محلول های فعال کننده اسپرم بر بهبود کارایی تولید مثل ماهی آزاد وحشی دریای خزر انجام شد (۴). نتایج این تحقیق نشان دادکه فعال کننده ها در میزان چشم زدگی و تخم گشایی تاثیری نداشته است. در مورد ماهی آزاد پرورشی دریای خزر که از کیفیت لقاح پایین تری نسبت به وحشی برخوردارند نیز این فعال کننده ها بر افزایش میزان چشم زدگی و تخم گشایی در اواسط فصل تکثیر تاثیری نداشته است استفاده از محلول‌های فعال‌کننده اسپرم مورد تحقیق، تأثیرات معنی‌دار مثبتی در افزایش مدت زمان تحرک اسپرم ماهی آزاد پرورشی دریای خزر در اواسط فصل تکثیر این ماهی داشته اما کیفیت بالای اسپرم این ماهی در اواسط فصل تکثیر یعنی بالاترین مدت زمان تحرک، غلظت مناسب در گروه شاهد مؤید آن است که در این دوره، تکثیر در بالاترین میزان خود بوده و نیازی به استفاده از فعال کننده های اسپرم نمی باشد و در صورت افت کیفیت اسپرم در اواخر دوره تکثیر استفاده از محلول های فعال کننده می تواند روند تکثیر مصنوعی این ماهی ارزشمند و در معرض خطر انقراض را بهبود بخشد.

منابع

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

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

۳-حسینی، س، ش. ۱۳۸۸. تاثیر محلول های فعال کننده اسپرم بر بهبود کارایی تولیدمثل ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان(*Oncorhynchus mykiss*) در اواخر فصل تکثیر، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات دانشگاه آزاد لاهیجان، ۱۰۸ ص.

۴-رضوانی ،م،۱۳۸۹. بررسی اثر محلولهای فعال کننده اسپرم بر کارایی تکثیر مصنوعی ماهی آزاد وحشی دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)در اواسط فصل تکثیر، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات دانشگاه آزاد لاهیجان،۷۲ص.

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

۶-علوی، ه. ۱۳۸۱. بررسی مقایسه‌ای تحرک اسپرم تاسماهی ایرانی و قابلیت لقاحی آن در آب شیرین و محلول‌های نمکی، پایان‌نامه کارشناسی ارشدشیلات، دانشگاه تهران، ۱۰۵ص.

۷-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، ص۱۳۲-۱۴۲.

۸-لرستانی، ر.، ۱۳۸۳. اثر سن مولد نر و محلول‌های تقویت‌کننده بر مدت زمان تحرک اسپرم و میزان باروری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، پایان نامه کارشناسی ارشدشیلات، دانشگاه تربیت مدرس ،دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، ۶۷ ص.

۹-لرستانی، ر.، احمدی م. ر. و کلباسی م. ر.، ۱۳۸۶. همبستگی خصوصیات کیفی اسپرم مولدین نر در روند تکثیر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله منابع طبیعی ایران، دانشکده منابع طبیعی تهران، دوره ۶۰، شماره ۱، بهار ۱۳۸۶. ص: ۱۶۸-۱۴۱.

۱۰-یگانه، س.۱۳۸۱؛ اثر فعال‌کننده‌ها بر روی مدت تحرک اسپرم و توان لقاح در کفال خاکستری*Mugil cephalus*، پایان‌نامه کارشناسی ارشدشیلات ، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۱۱۲ ص.

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

12-Alavi, S.M.H. Rodina, M.Viveiros, A.T.M. Cosson, J.Gela, D.Boryshpolets, S. and Linhart, O. 2009.Effects of osmolality on spermmorphology, motility and flagellarwave parameters in Northern pike (*Esoxlucius L.*)Theriogenology (2009) Article in press.

13-Babiak.I, Ottesen.R, Rudolfsen.O, and Johnsen, S. 2006. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., sementhroughout the reproductive season. Theriogenology 65 1587–1604.

14-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.

15-Billard, R. 1986.Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species.Reprod. Nutr. Develop. 26 (4): 877-920.

16-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.

17-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.

18-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.

19-Billard, R. Cosson, J. Perchec, G. and Linhart. O. 1995.Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture, 124: 95-112.

20-Cheel, G. and Clark, W. 1984.An acrosome reaction in sperm from the white sturgeon *(A. transmontanus)*.Journal of Experimental Zoology, NO. 232129-139.

21-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.

22-Lee, C.S. and Donaldson, E.M. 2001.General discussion on "Reproductive biotechnology in finfish aquaculture. Aquaculture, 197: 303-320.

23-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 ivitro fertilization. Can.J. Fish. Aquat. Sci. 59: 144-152.

24-Melamed, P. Gong, Z. Fletcher, G. and Hew, G.L 2002.The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. Aquaculture, 255-269.

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.

Effect of sperm activating solutions on the performance of artificial reproduction in *Salmo trutta caspius* at the mid of propagation season

Reza Khani SH.[(1)*]; Sadegh Pour A.[(1)]; Khara H.[(1)]; Lorestani R.[(1)]

rezakhani@yahoo.com

1-Islamic Azad University Lahijan Branch, Lahijan, Iran.

Received: December 2012 Accepted: March 2013

Abstract

The appropriate quality of sperm whose important feature is movement , can cause increased fertilization. As the quality of sperms and ova were reduced at the end of the propagation period, and this problem may cause quality decrease of production, this research has been conducted in order to increase the efficiency of reproduction fertilization, by using activating solution at the mid of propagation season at the salmonid reproduction and conservation center of ShahidBahonar–Kelardasht in late 2012.In this regard, firstly 14 activating solutions with different component have been selected and were used in preliminary studies and finally, 7 activating solutions on the basis of compound and duration of sperm movement have been chosen for final surveys. In order to survey of the 7 selected solutions as well as distilled water, hatchery water (As control group) and physiology serum , on the duration of sperm movement, fertilization rate, eyed egg and hatching, 5 females and 5males of rainbow trout were randomly selected.Results showed that, among surveyed items, the activating solutions had significant difference comparing with each other and also the control group.The highest duration of sperm movement was produced by the number 1 ($NaCl$ = 6gr/L,$CaCl_2.2H_2O$ = 0.2gr/L , $CO(NH_2)_2$= 4.50gr/L, pH=7.6) and 6 ($CaCl_2.2H_2O$=./735 gr/L,NaCl=7/305 gr/L ,pH=7/7)Activating solutions which have significant difference with the other groups and also the control group. But fertilization, eyeing and hatching rate have not significant different with control group. Final conclusion confirmed that, the sperm activating solutions have positive and significant effects on extending the time length of sperms movement of *Salmo caspius* but there was no significant differencein surveyed items consist of fertilization, eyeing and hatching rates comparing with control group.

Keywords: sperm activating solutions, *Salmo trutta caspius*, sperm movement, fertilization.

*Corresponding author