نشریه فن‌آوری‌های نوین در توسعه آبزی‌پروری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر/ ISSN: 2008-0026 سال سیزدهم، شماره اول، بهار ۹۸ / صفحات: ۱۲-۱

اثر محلول‌های فعال‌کننده اسپرم بر کارایی تکثیر مصنوعی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

مصطفی رضوانی[۱]، *حسین خارا[۱] و سمیه شمس‌پور[۲]

[۱]گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران،

[۲]باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۷/۱۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱۷

چکیده

کیفیت مناسب اسپرم که مهم‌ترین مشخصه آن تحرک می‌باشد، می‌تواند سبب افزایش لقاح گردد. از آن‌جایی‌که کیفیت اسپرم‌ها و تخمک‌ها در طول دوره تکثیر به مرور کاهش می‌یابد و این مسأله سبب پایین آمدن کیفیت کار تکثیر خواهد شد، پژوهش حاضر به‌منظور افزایش کارایی تولیدمثل با استفاده از فعال‌کننده‌ها در اواسط فصل تکثیر انجام گرفت. بدین‌منظور ۱٤ محلول فعال‌کننده با ترکیبات مختلف مورد آزمایش قرار گرفته و از بین آن‌ها ۷ محلول بر اساس افزایش مدت زمان تحرک اسپرم برای انجام پژوهش حاضر انتخاب شدند. اثر ۷ محلول فعال‌کننده و همچنین آب مقطر، سرم فیزیولوژی و آب کارگاه به‌عنوان شاهد، بر مدت زمان تحرک اسپرم، میزان لقاح، چشم‌زدگی و تخم‌گشایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در مورد فاکتور تحرک اسپرم، محلول‌های فعال‌کننده اسپرم اختلاف معنی‌داری در مقایسه با هم و با گروه شاهد دارند. فعال‌کننده ۱ با ترکیب NaCl=٦ gr/L، $CaCl_2.2H_2O$=۰/۲ gr/L و $CO(NH_2)_2$ = ٤/٥۰ gr/L با pH=۷/٦ و فعال‌کننده ٦ با ترکیب $CaCl_2.2H_2O$= ۰/۷۳٥ gr/L، NaCl= ۷/۳۰٥gr/L با pH=۷/۷ بالاترین مدت زمان تحرک را سبب گردیدند. اما میزان لقاح، چشم‌زدگی و تخم‌گشایی در تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان ندادند. نتایج بیانگر آن است که استفاده از محلول‌های فعال‌کننده اسپرم مورد پژوهش، تأثیرات معنی‌دار مثبتی در افزایش مدت زمان تحرک اسپرم ماهی آزاد دریای خزر داشتند و این امر می‌تواند بر کارایی تکثیر مصنوعی اثر مطلوبی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: تحرک اسپرم، لقاح، ماهی آزاد دریای خزر، محلول فعال‌کننده اسپرم

مقدمه

آبزی‌پروری قرن‌هاست که در جوامع مختلف در حال انجام است (Lee و Donaldson، ۲۰۰۱)، اما تنها در چند دهه گذشته صنعتی شده است (Melamed و همکاران، ۲۰۰۲). کاهش نسل ماهیان به‌دلیل صید بی‌رویه، بشر را به فکر تکثیر و پرورش مصنوعی ماهیان جهت جبران این نقیصه انداخت. از این‌رو بهبود کیفیت مواد تناسلی مولدین و کنترل تولیدمثل، می‌تواند ما را در دستیابی به تقاضای روزافزون و در حال رشد آبزی‌پروری در جهان کمک کند (Billard و همکاران، ۱۹۹۵). یکی از عوامل مهم در فرآیند لقاح، اسپرم است. بنابراین کیفیت مناسب اسپرم که مهم‌ترین مشخصه آن تحرک می‌باشد، می‌تواند سبب افزایش لقاح گردد (یگانه، ۱۳۸۱). آزمایش‌هایی که در مورد به تأخیر افتادن لقاح

* نویسنده مسئول: h.khara1974@yahoo.com

گامت‌ها بعد از فعال‌سازی صورت گرفته است به وضوح نشان می‌دهد که میزان لقاح تابع تحرک اسپرم می‌باشد (Liley و همکاران، ۲۰۰۲). به‌طورکلی استفاده از محلول فیزیولوژیکی ایزوتونیک مانع تغییرات ساختاری اسپرماتوزوآ می‌گردد. پژوهش‌های جدید بر روی مواد تناسلی ماهی کپور به‌خصوص 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 (احمدیان و همکاران، ۱۳۸۱). اسپرماتوزوآی ماهیان در بیضه و پلاسمای منی فاقد تحرک می‌باشد (Stoss، ۱۹۸۳). عدم تحرک اسپرماتوزوآ در کپورماهیان به‌دلیل فشار اسمزی (Stoss، ۱۹۸۳؛ Billard و Cosson، ۱۹۸٦) و در آزادماهیان (Stoss، ۱۹۸۳؛ Billard، ۱۹۸۳) و احتمالاً ماهیان خاویاری (علوی، ۱۳۸۱) به‌دلیل یون پتاسیم موجود در پلاسمای منی می‌باشد. مدت زمان تحرک اسپرم، درصد سلول‌های متحرک و سرعت تحرک اسپرماتوزوآ، با توجه به گونه ماهی، دما، ترکیب رقیق‌کننده و همچنین نسبت رقیق‌سازی متفاوت می‌باشد (Billard، ۱۹۸٦) 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 (Billard و Cosson، ۱۹۸۹) پس می‌توان عنوان نمود که کیفیت منی یکی از فاکتورهایی است که می‌تواند درصد لقاح را تحت‌تأثیر قرار دهد و می‌توان از آن به‌عنوان توانایی برای باروری تخم‌ها نام برد.

با توجه به این مطلب که کیفیت اسپرم‌ها و تخمک‌ها در پایان دوره تکثیر کاهش می‌یابد و این مسأله سبب افت کیفیت تکثیر خواهد شد، واضح است که اجرای این پژوهش می‌تواند گامی در جهت بهبود فرآیند تکثیر و انجام موفق‌تر آن در فصل تولیدمثل باشد. هدف از این پژوهش بررسی اثر محلول‌های مختلف فعال‌کننده نمکی اسپرم بر میزان درصد لقاح ماهی آزاد دریای خزر است تا با یافتن فعال‌کننده مناسب برای اسپرم این ماهی ارزشمند که یکی از گونه‌های مهم اقتصادی کشور می‌باشد، باعث افزایش کارایی لقاح مصنوعی در فصل تکثیر و تولید بیش‌تر آن شود.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در پاییز سال ۱۳۸۹ و در مرکز بازسازی ذخایر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت واقع در غرب استان مازندران انجام شد. جهت آماده‌سازی 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 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.

از میان محلول‌های فعال‌کننده متفاوت، پنج محلول که باعث بیش‌ترین مدت زمان تحرک اسپرم گردید، انتخاب شدند. بدین‌منظور، اسپرم استحصال شده از ٤ 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 (کلباسی و لرستانی، ۱۳۸۵). یک قطره اسپرم را روی لام در زیر میکروسکوپ قرار داده و جهت فعال‌سازی آن، یک قطره آب مقطر به‌عنوان گروه شاهد استفاده شد و هم‌زمان به‌وسیله کرنومتر مدت زمان تحرک ثبت گردید (علوی، ۱۳۸۱؛ یگانه، ۱۳۸۱؛ Ass و همکاران، ۱۹۹۱). جهت سنجش اثر فعال‌کننده‌های متفاوت اسپرم بر مدت زمان تحرک

اسپرم، همانند گروه شاهد عمل شد با این تفاوت که جهت فعال‌سازی اسپرم به‌جای آب، از فعال‌کننده‌ها استفاده گردید (احمدیان و همکاران، ۱۳۸۱؛ علوی، ۱۳۸۱؛ یگانه، ۱۳۸۱) و مدت زمان تحرک اسپرم در گروه شاهد و در تمامی فعال‌کننده‌ها در سه تکرار ثبت گردید. ۲ محلول فعال‌کننده دیگر (محلول‌های ۳ و ۵) نیز برای تکمیل نتایج به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. در نهایت ۵ فعال‌کننده که باعث بیش‌ترین مدت زمان تحرک شدند، ۲ محلول فعال‌کننده تصادفی و محلول‌های شاهد (آب کارگاه، آب مقطر و سرم فیزیولوژی) جهت انجام لقاح‌ها به‌کار رفتند.

بعد از ساخت محلول‌های فعال‌کننده، EC محلول‌ها با استفاده از دستگاه مدل Metrohm/644 Conductometer ساخت کشور سوئیس محاسبه گردید. pH آن‌ها با استفاده از دستگاه pH متر مدل HANNA 211 ساخت کشور آلمان تعیین شد.

جدول ۱- ترکیبات محلول‌های انتخاب شده جهت انجام لقاح‌ها بر حسب گرم بر لیتر

مواد / محلول	pH	$NaHCO_3$	$MgSO_4.7H_2O$	KCl	Glycin	Tris	$CO(NH_2)_2$	$CaCl_2.2H_2O$	NaCl
گروه شاهد	۷/۷					آب کارگاه			
	۷					آب مقطر			
						سرم فیزیولوژی			
محلول ۱	۷/٦	–	–	–	–	–	٤/٥٠	/۲	٦
محلول ۲	۸/٤	–	–	–	۳/۷٥	۲/٤۲۲	–	–	٥/٥٤
*محلول ۳	۹	–	–	–	۲/۲٥	۲/٤۲۲	–	–	۷/۳۰٥
محلول ٤	۹	–	۰/۳۲	۰/۲۳	–	–	–	/۲٦٤	۹/۰٥۸
*محلول ٥	۸	۸/٤۰۱	–	–	–	–	–	–	–
محلول ٦	۷/۷	–	–	–	–	–	–	۰/۷۳٥	۷/۳۰٥
محلول ۱۱	۹	–	–	۰/۲	–	–	–	۰/۳	۹

* محلول‌هایی که به‌صورت تصادفی جهت تکمیل تحقیق انتخاب شدند.

جهت انجام عملیات تکثیر از ۵ ماهی ماده و ۹ ماهی نر استفاده شد. در ابتدا ماهی‌های ماده را به‌وسیله عصاره گل میخک بیهوش نموده و تخمک‌های مورد نیاز جهت لقاح تهیه گردید. پس از بیهوش کردن مولدین نر در ابتدا به‌طور جداگانه اسپرم‌گیری شدند استحصال اسپرم مستقیماً از سوراخ تناسلی مولدین نر بعد از خشک کردن اطراف سوراخ تناسلی انجام شد. 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 (Billard، ۱۹۸۳). به‌منظور سنجش تأثیر 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، در مجموع 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 (Billard، ۱۹۸۳).

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 به‌جای آب، جهت فعال‌سازی اسپرم و تکمیل لقاح استفاده گردید. تخمک‌های لقاح‌یافته 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.

به‌منظور سنجش مدت زمان تحرک، در ابتدا اسپرم مولدین نر هر گروه به‌صورت جداگانه و سپس مخلوط اسپرم‌های مولدین به‌صورت گروه‌های ۵ تایی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای سنجش تأثیر 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 تا ۹۹ درصد میزان اسپرم‌ها متوقف شوند در نظر گرفته شد (Ass و همکاران، ۱۹۹۱؛ Billard، ۱۹۸۳؛ Cosson و همکاران، ۱۹۹۹؛ Liley و همکاران، ۲۰۰۲). طول دوره تحرک موجی اسپرماتوزوئیدها تا پایان تحرک گروهی و موجی شکل آن‌ها در نظر گرفته شد. این سنجش‌ها برای فعال‌کننده‌ها (احمدیان و همکاران، ۱۳۸۱؛ پیکان حیرتی و همکاران، ۱۳۸۰؛ حسینی و همکاران، ۱۳۹؛ علوی، ۱۳۷۹؛ علوی، ۱۳۸۱؛ کلباسی و لرستانی، ۱۳۸۵؛ Alvi و همکاران، ۲۰۰۹) و گروه شاهد (آب مقطر، آب کارگاه و سرم فیزیولوژی)، حداقل ۳ بار به‌عنوان ۳ تکرار در هر یک از گروه‌ها محاسبه و سپس ثبت شد. جهت انجام انکوباسیون تخم‌های لقاح‌یافته، ۱ تراف و ۳ سینی به‌کار رفت. هر سینی توسط نئوپلاست به ۱۲ قسمت مساوی تقسیم شد و تمام قسمت‌های تقسیم‌بندی شده سینی‌ها به‌طور تصادفی شماره‌گذاری شدند و تخمک‌های لقاح‌یافته، پس از جذب آب، به‌طور کاملاً تصادفی بر حسب شماره‌های معین‌شده، در جایگاه خود در سینی‌ها قرار گرفتند. از ۲ روز بعد از لقاح تا بعد از مشاهده اولین چشم‌زدگی تخم‌ها، تخم‌ها به‌وسیله 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 به‌مدت ٤٥ تا ٦٠ دقیقه در معرض این ماده قرار می‌گرفتند (شرایط معمول کارگاه). برای تعیین درصد لقاح حدود ۱۰۰ عدد تخمک، پس از شفاف‌سازی به‌وسیله محلول شفاف‌کننده[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 (Billard و همکاران، ۱۹۹۵):

۱۰۰ × (تعداد کل تخمک‌ها / تعداد تخمک‌های لقاح‌یافته)
= درصد لقاح

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

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

رابطه ۲ (Billard و همکاران، ۱۹۹۵):

۱۰۰ × (تعداد تخمک‌های لقاح‌یافته/ تعداد تخم‌های چشم‌زده) = درصد چشم‌زدگی

بعد از جمع‌آوری تلفات در روز چشم‌زدگی، تخم‌های چشم‌زده پس از شمارش در سینی‌های چشمه درشت قرار گرفتند. با تخم‌گشایی تخم‌ها و خارج شدن لارو و پوسته از چشمه سینی به درون تراف، تخم‌های تخم‌گشایی‌نشده و تلف‌شده در سینی‌ها باقی ماندند که پس از شمارش آن‌ها میزان تخم‌گشایی از طریق رابطه ۳ به‌دست آمده و ثبت گردید.

رابطه ۳ (Billard و همکاران، ۱۹۹۵):

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

اطلاعات جمع‌آوری‌شده از بررسی‌ها و مطالعات میدانی و آزمایشگاهی با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS 13 و Excel 2003 و به‌شرح زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در ابتدا جهت بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون Shapiro-Wilk's استفاده گردید. زمانی‌که توزیع داده‌ها نرمال بوده جهت مقایسه هر یک از فاکتورهای اندازه‌گیری‌شده بین گروه‌های مختلف سنی ماهیان از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (Oneway Anova) و زمانی‌که توزیع داده‌ها نرمال نبوده، جهت بررسی هر یک از فاکتورها بین گروه‌های مختلف سنی از آزمون ناپارامتریک کروسکال- والیس (Kruskal-Wallis) در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شده است. جهت مقایسه گروه‌های آزمایشی با یکدیگر در حالت غیرنرمال از آزمون من- ویتنی استفاده گردیده است.

نتایج

میانگین و انحراف معیار طول کل و طول چنگالی ماهیان نر مورد استفاده در این پژوهش به‌ترتیب ۱۰/۵ ± ۵۵/۲۲ و ۹/٤ ± ۵۰/٤٤ سانتی‌متر بود. کم‌ترین طول کل و طول چنگالی در ماهیان نر به‌ترتیب ٤۱ و ۳۸ سانتی‌متر و بیش‌ترین طول کل و طول چنگالی آن‌ها به‌ترتیب ۷۰ و ٦٦ سانتی‌متر بود (جدول ۲). همچنین از ماهیان ماده با متوسط طول کل و طول چنگالی به‌ترتیب ۵/۹ ± ۵۹/۲ و ٤/۹۷ ± ۵٤/۸ سانتی‌متر استفاده شد که حداقل و حداکثر آن‌ها به‌ترتیب ٦٦-۵۲ و ٦۰-٤۹ بودند (جدول ۳).

میانگین و انحراف معیار وزن مولدین نر مورد استفاده در پژوهش ۸۷۷/۷ ± ۱۸۵۵/۵٦ گرم که حداقل و حداکثر آن به‌ترتیب ۸۰۰ و ۳٤۰۰ گرم بود و در مولدین ماده میانگین و انحراف معیار وزن ۵۸۵/۷ ± ۲۰٦۰ گرم با حداقل و حداکثر وزن ۱٤۰۰ و ۲۷۰۰ گرم بودند (جدول‌های ۲ و ۳).

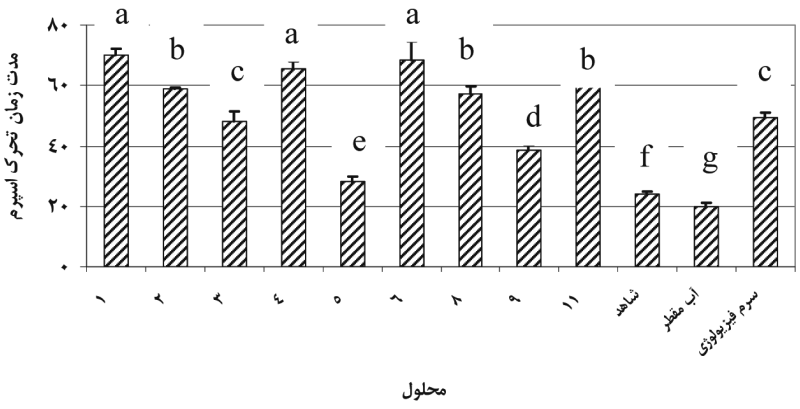
جدول ۲- زیست‌سنجی مولدین نر ماهی آزاد (N=۹)

فاکتور	حداقل	حداکثر	میانگین ± انحراف معیار
طول کل (سانتی متر)	٤۱	۷۰	۵۵/۲۲ ± ۱۰/۵
طول چنگالی (سانتی متر)	۳۸	٦٦	۵۰/٤٤ ± ۹/٤
وزن (گرم)	۸۰۰	۳٤۰۰	۱۸۵۵/۵٦ ± ۸۷۷/۷

جدول ۳- زیست‌سنجی مولدین ماده ماهی آزاد (N=۵)

فاکتور	حداقل	حداکثر	میانگین ± انحراف معیار
طول کل (سانتی متر)	۵۲	٦٦	۵۹/۲ ± ۵/۹
طول چنگالی (سانتی متر)	٤۹	٦۰	۵٤/۸ ± ٤/۹۷
وزن (گرم)	۱٤۰۰	۲۷۰۰	۲۰٦۰ ± ۵۸۵/۷

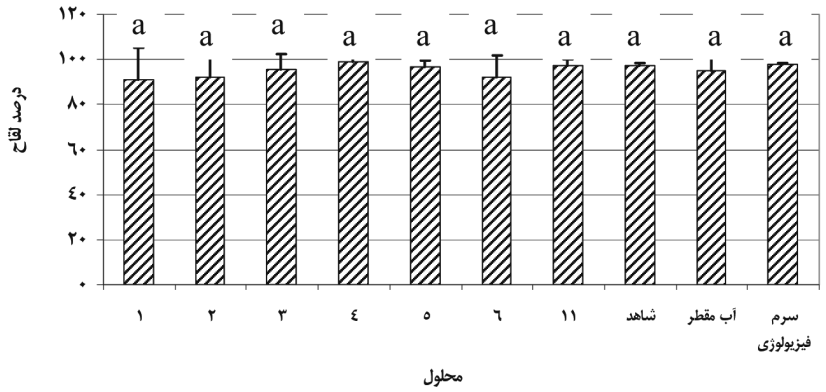
نتایج آزمون کروسکال- والیس نشان داد که بین محلول‌های فعال‌کننده مورد بررسی از نظر فاکتور مدت زمان تحرک اسپرم اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌گردد (Chi-Square = ۳٤/۱، df = ۱۱، P=۰/۰۰) (شکل ۱).



شکل ۱- نمودار میانگین مدت زمان تحرک اسپرم در حضور فعال‌کننده‌های اسپرم به‌کار رفته در پژوهش

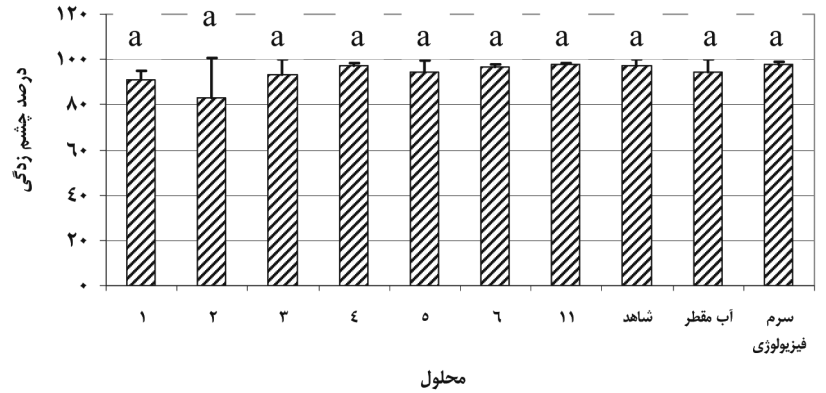
نتایج به‌دست آمده در مورد انتخاب محلول‌های موردنظر نشان داد که، محلول فعال‌کننده ۱، ٤ و ٦ اختلاف معنی‌دار آماری نداشته و بالاترین مدت زمان تحرک اسپرم را سبب شدند. فعال‌کننده ۲، ۸ و ۱۱ به‌ترتیب در جایگاه بعدی قرار گرفتند. گروه شاهد یعنی آب کارگاه و آب مقطر (به‌ترتیب ۱ ± ۲٤ و ۱ ± ۲۰ ثانیه) اختلاف معنی‌داری با فعال‌کننده‌های مطرح شده داشتند و نسبت به آن‌ها تحرک کم‌تری را دارا بودند. بین فعال‌کننده‌های ۷، ۱۰ اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشته و تحرک اسپرم در حضور این فعال‌کننده‌ها مشاهده نگردید.

با توجه به آزمون کروسکال- والیس انجام گرفته، بین محلول‌های مورد بررسی از نظر فاکتور درصد لقاح اندازه‌گیری‌شده اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (شکل ۲).



شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین درصد لقاح در حضور فعال‌کننده‌های اسپرم به‌کار رفته در پژوهش

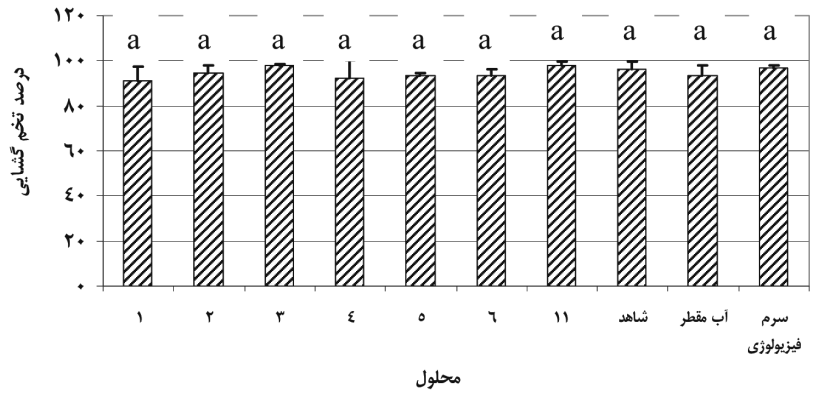
نتایج آزمون کروسکال- والیس در مورد اثر فعال‌کننده‌های مورد بررسی بر میزان چشم‌زدگی تخم‌ها نشان داد که بین محلول‌ها از نظر فاکتور درصد چشم‌زدگی اندازه‌گیری‌شده، اختلاف معنی‌دار آماری وجود ندارد (P>۰/۰۵) (شکل ۳).



شکل ۳- نمودار مقایسه میانگین درصد چشم‌زدگی در حضور فعال‌کننده‌های اسپرم به‌کار رفته در پژوهش

نتیجه آزمون کروسکال- والیس در مورد اثر فعال‌کننده‌های متفاوت بر درصد تخم‌گشایی نشان داد که بین محلول‌ها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نمی‌گردد (P>۰/۰۵) (شکل ٤).

(Sig. = ۰/۱٤۸ ،df = ۹ ،Chi-Square = ۱۳/۳۸۷)



شکل ٤- نمودار مقایسه میانگین درصد تخم‌گشایی در حضور فعال‌کننده‌های اسپرم به‌کار رفته در پژوهش

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 پژوهش‌های علوی (۱۳۷۹)، لرستانی و همکاران (۱۳۸۵) و حسینی و همکاران (۱۳۸۸) مشابه با پژوهش حاضر بوده است.

با مقایسه ترکیبات فعال‌کننده‌های متفاوت دیده می‌شود که در بین فعال‌کننده‌های متفاوت اسپرم ارائه شده دو فعال‌کننده ۱ و ٦، سبب بالاترین میزان تحرک در مقایسه با دیگر گروه‌ها شده‌اند. شاید دلیل این امر این باشد که در این دو فعال‌کننده، برهم‌کنش یون‌ها، فشار اسمزی، pH و ... محیط مناسب‌تری را برای سلول‌های اسپرم ماهی آزاد دریای خزر در اواسط فصل تکثیر در مقایسه با دیگر فعال‌کننده‌ها، ایجاد کرده باشند. اثر تجمعی یون‌ها باعث شده است که پژوهشگران اثبات کنند که امکان کنترل تحرک اسپرماتوزوآ با تغییر پتانسیل غشاء، از طریق ترکیب تأثیر چندین یون وجود دارد (Cosson و همکاران، ۱۹۹۹).

تحرک اسپرم در آزادماهیان و کپورماهیان توسط Billard و Cosson (۱۹۸٦) مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد، زمانی که یک میلی‌مول کلسیم به فعال‌کننده: NaCl=۱۲٥ g/L، Tris=۲۰ Mm با pH=۹ اضافه شود، مدت زمان تحرک اسپرم فراتر از ۳۰ ثانیه به طول می‌انجامد که با مشاهده تقویت‌کننده ٦ نیز این امر مشخص و واضح است. همچنین گزارش شده که Ca^{++} جهت واکنش آکروزومی و تحرک اسپرم در *Acipenser transmontanus* نتایج مثبتی داشته است (Cheel و Clar، ۱۹۸٤).

از طرفی در ترکیب فعال‌کننده ٦، یون کلسیم که یون ضروری جهت آغاز تحرک اسپرماتوزوآ در اسپرم آزاد ماهیان است (Billard و Cosson، ۱۹۹۲) وجود دارد و این میزان در ترکیب فعال‌کننده ٦، نسبت به فعال‌کننده‌های دیگر مورد پژوهش، بالاتر می‌باشد. یون کلسیم مهم‌ترین فاکتور جهت القاء و تجدید مدت زمان تحرک اسپرم می‌باشد (لرستانی و همکاران، ۱۳۸٥) از آن‌جا که با اضافه نمودن ۱ میلی‌مول کلسیم به محلول‌های فعال‌کننده اسپرم، مدت زمان تحرک اسپرم فراتر از ۳۰ ثانیه به طول می‌انجامد

(Billard و Cosson، ۱۹۸۹) و از طرفی وجود یون‌های کلسیم و سدیم نیز اثر تقویت‌کنندگی بر مدت زمان تحرک اسپرم دارند (یگانه، ۱۳۸۱) پس عملکرد مناسب‌تر فعال‌کننده‌های ۱ و ٦ در مقایسه با گروه شاهد، به دلایل مختلف مانند وجود یون‌های متفاوت و مورد نیاز سلول‌های اسپرم جهت تداوم تحرک، ایجاد یک محیط با فشار اسمزی مناسب و ... قابل توجیه می‌باشد.

لرستانی و همکاران (۱۳۸۳) نیز، با به‌کارگیری محلول فعال‌کننده ٦، در اوایل فصل تکثیر، تأثیر فوق‌العاده محلول ٦ را گزارش کرده بودند که پژوهش حاضر، علاوه بر تأیید اثر مناسب محلول ٦ بر میزان تحرک اسپرم‌های آخر فصل مولدین نر، محلول ۱ را نیز یک محلول مناسب جهت افزایش تداوم تحرک برای به‌کارگیری آن در آخر فصل تکثیر، گزارش می‌نماید.

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

در روش‌های قدیمی لقاح مصنوعی، به‌جای فعال‌کننده از آب استفاده می‌شد. آب هم برای اسپرماتوزوآ و هم برای تخمک مضر می‌باشد (Billard و Cosson، ۱۹۹۲) 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 (احمدیان و همکاران، ۱۳۸۱).

نتایج این پژوهش نیز تأییدکننده نتایج به‌دست آمده توسط پژوهشگران بالا 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. پژوهشگران در پژوهش‌های متفاوت، محیط با pH مساوی ۹ را جهت تحرک سلول‌های اسپرماتوزوئید، محیطی مناسب ارزیابی نموده‌اند. در حالی‌که در پژوهش حاضر محلول‌های ۱ و ٦ که بالاترین مدت زمان تحرک اسپرم را سبب گشتند، به‌ترتیب pH ۷/٦ و ۷/۷ را نشان دادند.

با مقایسه نمودار مربوط در استفاده از فعال‌کننده‌های متفاوت اسپرم، این نکته به‌دست می‌آید که فعال‌کننده‌های متفاوت در تمامی گروه‌های مولدین نر، تأثیر تقریباً 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 حسینی و همکاران (۱۳۸۸) در پژوهش مشابهی روی اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در اواخر فصل تکثیر تأثیر مثبت فعال‌کننده‌های نمکی را در میزان لقاح تخمک‌ها و تخم‌گشایی نشان دادند. با این‌حال لرستانی و همکاران (۱۳۸٦) در بررسی همبستگی خصوصیات کیفی اسپرم مولدین نر در روند تکثیر قزل‌آلای رنگین‌کمان اعلام کردند که همبستگی بین مدت زمان تحرک اسپرم با میزان لقاح و چشم‌زدگی معنی‌دار نیست.

به‌طورکلی می‌توان 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 طبق گزارش‌های Alavi و همکاران (۲۰۰۹)، میزان تولید اسپرم در ابتدا و انتهای فصل تکثیر پایین بوده و برعکس تولید اسپرم در اواسط

فصل تکثیر، به‌طور ثابت و یکنواخت و به‌میزان بالاتر و همچنین محدودیت و کاهش تحرک اسپرماتوزوآ در ابتدا و انتهای فصل تکثیر مشاهده شده است، بنابراین می‌توان این‌گونه بیان نمود که همگی محلول‌های فعال‌کننده اسپرم در اواسط دوره تکثیر، لقاح را به حد بالای خود رسانده و حتی در گروه‌های شاهد شامل آب مقطر، آب کارگاه و سرم فیزیولوژی میزان بالای لقاح در تخمک‌ها 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 گروه‌ها نیز در میزان لقاح در بین گروه‌های دیگر اختلاف معنی‌داری را نشان ندهند. بیلارد (۱۹۸٦) نشان داد که غلظت اسپرم می‌تواند اثرات کاهش تحرک را در لقاح جبران کند. نتایج این گزارش را به‌وضوح می‌توان در مقایسه گروه‌های متفاوت این پژوهش، درک نمود. با مقایسه نتایج میزان چشم‌زدگی تخمک‌ها، به‌نظر می‌رسد که اسپرم‌های مولدین نر در اواسط دوره تکثیر از بالاترین کیفیت خود برخوردار بوده و اثر محلول‌های فعال‌کننده در مقایسه با گروه شاهد، اختلاف معنی‌داری را بروز نداده است و هم‌چنان این روند نیز با حد قابل‌قبول و مثبتی ادامه یافته است.

با بررسی نتایج حاصل از تخم‌گشایی، در اواسط فصل تکثیر، مشاهده می‌شود که هم‌چنان در تمامی فعال‌کننده‌های نمکی، اختلاف معنی‌داری در میزان تخم‌گشایی در مقایسه با گروه شاهد وجود ندارد. ممکن است این عامل به‌دلیل ایجاد لقاح پایداری باشد که در نتیجه تحرک مناسبی که این فعال‌کننده‌ها ایجاد کرده‌اند حاصل شده باشد که نتیجه آن در میزان بالاتر لقاح، چشم‌زدگی و تخم‌گشایی تمامی گروه‌های مورد مطالعه به چشم می‌خورد. با توجه به این‌که اسپرماتوزوآ تنها در یک نقطه یعنی میکروپیل می‌تواند در تخمک نفوذ کند (Billard، ۱۹۸٦) بنابراین طبیعی به‌نظر 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 چشم‌زدگی تخم‌ها و تخم‌گشایی تابعی از فرآیند لقاح می‌باشند، بنابراین اختلاف معنی‌داری در میزان چشم‌زدگی و تخم‌گشایی در حضور محلول‌های فعال‌کننده متفاوت دیده نشد.

Babiak و همکاران (۲۰۰٦) نیز خصوصیات کمی پلاسمای منی ماهی *Hippoglossus hippoglossus* را در طول فصل تکثیر بررسی کردند و نتیجه گرفتند که افزایش غلظت اسپرم، با پارامترهای کیفی اسپرم مانند تحرک اسپرماتوزوآ، درصد سلول‌های متحرک، حرکت موجی شکل و مستقیم اسپرماتوزوآ داری رابطه معنی‌داری بوده، و با افزایش غلظت اسپرم، پارامترهای یادشده کاهش یافته‌اند. نتایج پژوهش حاضر نیز در ارتباط با افزایش دوره تحرک اسپرماتوزوآ با کاهش غلظت اسپرم در اواسط فصل تکثیر، نتایج پژوهشگران یاد شده را تأیید می‌نماید.

استفاده از محلول‌های فعال‌کننده اسپرم مورد پژوهش، تأثیرات معنی‌دار مثبتی در افزایش مدت زمان تحرک اسپرم ماهی آزاد 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 بیانگر آن است که در این دوره، تکثیر در بالاترین میزان خود بوده و نیازی به استفاده از فعال‌کننده‌های اسپرم نمی‌باشد و در صورت افت کیفیت اسپرم در اواخر دوره تکثیر استفاده از محلول‌های فعال‌کننده می‌تواند روند تکثیر مصنوعی این ماهی ارزشمند و در معرض خطر انقراض را بهبود بخشد.

سپاسگزاری

بر خود لازم می‌دانیم قدردانی خویش را از همکاری صمیمانه کارشناسان مرکز بازسازی ذخائر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت به‌خصوص سرکار خانم مهندس سمیه شمس‌پور اعلام نماییم.

منابع

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.

پیکان حیرتی، ف.، مصطفوی، ح.، مجازی امیری، ب.، حاجی‌زاده، ع.، و درافشان، س.، ۱۳۸۰. اثر القایی هورمون مشابه GnRH در تولید اسپرم ماهی قزل‌آلای نر. مجله علمی شیلات ایران. دوره ۳. شماره ۲. صفحات ۹۵-۱۰۸.

حسینی، س.ش.، کلباسی، م.ر.، و لرستانی، ر.، ۱۳۸۹. تأثیر محلول‌های فعال‌کننده نمکی اسپرم بر موفقیت لقاح قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). نشریه شیلات. دوره ٤. شماره ۲. صفحات ٥٧-٦٦.

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

علوی، س.م.ه.، ۱۳۸۱. بررسی مقایسه‌ای تحرک اسپرم تاس‌ماهی ایرانی و قابلیت لقاحی آن در آب شیرین و محلول‌های نمکی. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشگاه تهران. دانشکده منابع طبیعی کرج. ۱۰۵ صفحه.

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 ۱۳۲-۱٤۲.

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. سال ۱۵. شماره ۱. صفحات ۱۱۹-۱۲۹.

لرستانی، ر.، احمدی، م.ر.، و کلباسی، م.ر.، ۱۳۸٦. همبستگی خصوصیات کیفی اسپرم مولدین نر در روند تکثیر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله منابع طبیعی ایران. دانشکده منابع طبیعی تهران. شماره ۱. بهار ۱۳۸٦، صفحات ۱٤۱-۱٦۸.

یگانه، س.، ۱۳۸۱. اثر فعال‌کننده‌ها بر روی مدت تحرک اسپرم و توان لقاح در کفال خاکستری *Mugil cephalus*. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران. ۱۱۲ صفحه.

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

Alavi, S.M.H., Rodina, M., Viveiros, A.T.M., Cosson, J., Gela, D., Boryshpolets, S., and Linhart, O., 2009. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.) Theriogenology (2009) Article in press.

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

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.

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

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.

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.

Billard, R., and Cosson, M.P., 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. J. Exper. Zool. 261, 122-131.

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

Cheel, G., and Clark, W., 1984. An acrosome reaction in sperm from the white sturgeon (*A. transmontanus*). J. Exper. Zool. 232, 129-139.

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, pp. 161-186.

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

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.

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

New Technologies in Aquaculture Development, Islamic Azad University, Azadshahr Branch
Vol. 13, No. 1, Spring 2019

Effect of sperm activating solution on artificial reproduction efficiency in *Salmo trutta caspius*

M. Rezvani[1], *H. Khara[1] and S. Shamspour[2]
[1]Dept. of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran,
[2]Young Researchers Club and Elite, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

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. 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 chose for final surveys. In order to survey of the 7 selected solution 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 female and 9 male of rainbow trout were randomly select. Results showed that, among surveyed items, the activating solutions had significant different comparing with each other and also the control group. The highest duration of sperm movement were produced by the number 1 (NaCl = 6 gr/L, $CaCl_2.2H_2O$ = 0.2 gr/L, $CO(NH_2)_2$ = 4.50 gr/L, pH=7.6) and 6 ($CaCl_2.2H_2O$ = 0.735 gr/L, NaCl = 7.305 gr/L, pH=7.7) Activating solutions. 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 trutta caspius* but have not significant different in surveyed items consist of fertilization, eyeing and hatching rates comparing with control group.

Keywords: Sperm movement; Fertilization; *Salmo trutta caspius*; Sperm activating solution

* Corresponding author; h.khara1974@yahoo.com