مجله شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر سال پنجم، شماره دوم، تابستان 90 / صفحات: 56- 47

تأثیر اسپرم‌گیری مجدد بر روی برخی پارامترهای اسپرم‌شناختی، درصد لقاح و روند انکوباسیون در ماهی آزاد پرورشی (*Salmo trutta caspius*, Kessler 1877)

حسین خارا[1]، سمیه شمس‌پور[1]، مصطفی رضوانی[2]، محدثه احمدنژاد[3]، مینا رهبر[1] و سیدسمانه موسوی[1]

[1]دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، دانشکده منابع‌طبیعی، گروه شیلات، لاهیجان، ایران، [2]مرکز بازسازی ذخایر آزادماهیان شهیدباهنر کلاردشت، کلاردشت، ایران، [3]پژوهشکده آبزی‌پروری آبهای داخلی، بندرانزلی، ایران

تاریخ دریافت: 89/9/25 ؛ تاریخ پذیرش: 89/12/23

چکیده

تحقیق حاضر در سال 1388 در مرکز بازسازی ذخائر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت صورت گرفت. جهت انجام آن، از 9 قطعه مولد نر هم‌سن (3 ساله) و 11 قطعه مولد ماده ماهی آزاد دریای خزر که در مرکز پرورش یافته بودند، استفاده شد. در مرحله اول از همه مولدین نر (9 مولد) به‌صورت جداگانه اسپرم‌گیری صورت گرفت. عمل لقاح با مخلوط اسپرم‌های هر گروه و تخمک‌های استحصال شده از 5 قطعه مولد ماده انجام شد و پس از آب‌گیری تخم‌ها، به 3 سینی در یک تراف در سالن انکوباسیون انتقال یافتند تا روند انکوباسیون در آنها بررسی شود. 14 روز بعد دومین مرحله اسپرم‌گیری و 27 روز بعد از مرحله دوم، سومین مرحله اسپرم‌گیری نیز همانند مرحله اول اجرا شد و برای هر مرحله نیز از 3 قطعه مولد ماده استفاده شد. در پایان هر 3 مرحله، تراکم اسپرم، درصد اسپرماتوکریت، حجم اسپرم، میزان تحرک و مورفولوژی اسپرماتوزوئید (درصد اسپرماتوزوئید های غیرطبیعی) ثبت شد و اثر آن بر روی درصد لقاح، چشم‌زدگی، تخم‌گشایی و در پایان بازماندگی لاروهای حاصل در طی اسپرم‌گیری های مکرر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حجم، تحرک، مرفولوژی اسپرم و درصد لقاح در 3 مرحله از تحقیق اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($P<0/05$). بیشترین درصد لقاح در مرحله اول (97/33 ±1/53٪) و کمترین آن در مرحله سوم (75 ± 6/25٪) مشاهده شد. اما تراکم اسپرم، اسپرماتوکریت، درصد چشم‌زدگی، تخم‌گشایی و بازماندگی لارو در 3 مرحله اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>0/05$). البته با توجه به آزمون LSD، درصد بازماندگی لارو در مرحله 2 و 3 اختلاف داشته است.

واژه‌های کلیدی: اسپرم‌گیری مجدد، درصد لقاح، ماهی آزاد دریای خزر

مقدمه

دسترسی به اسپرم با کیفیت مناسب یکی از عوامل مهم و ضروری در جهت افزایش کارایی تکثیر مصنوعی ماهیان است (Hajirezaee و همکاران، 2009). کیفیت اسپرم یک عامل تعیین کننده در توانایی لقاح می‌باشد که می‌تواند تحت تأثیر عوامل متعدد خارجی و یا نحوه مدیریت مولدین قرار گیرد (Bobe و Labbé، 2009). جهت بررسی کیفیت اسپرم می‌توان به ارزیابی تراکم اسپرم (Trippel و Neilson، 1992؛ Suquet و همکاران، 1992) وضعیت و تحرک اسپرم (کل دوره تحرک، سرعت و درصد اسپرم‌های متحرک بعد از فعال‌سازی (Cosson

* مسئول مکاتبه: h_ khara1974@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

و همکاران، 1999؛ Cosson و همکاران، 2000؛ Linhart و همکاران، 2002) و pH اسپرم (Lahnsteiner و همکاران، 1998)، به‌عنوان شاخص‌های کیفی اسپرم پرداخت.

ارزیابی کیفیت اسپرم جهت افزایش کارایی تکثیر مصنوعی حائز اهمیت می‌باشد، ولی معمولاً در صنعت آبزی‌پروری بیشتر به کیفیت تخم توجه می‌شود و در مورد کیفیت اسپرم توجه جدی صورت نمی‌گیرد. این در حالی است که کیفیت هر دو نوع گامت روی موفقیت لقاح و بقای لارو مؤثر است (Rurangwa و همکاران، 2004). طی فعالیت‌های تکثیر مصنوعی از ماهیان نر بالغ، در صورت نیاز بیش از یک‌بار اسپرم‌گیری می‌شود که این امر به‌دلیل کمبود تعداد مولدین نر و یا بلوغ دیررس آنها است (Dettlaff و همکاران، 1993؛ Piros و همکاران، 2002). براساس مطالعات گذشته بین اسپرم استحصالی از نرهای مختلف یا حتی در مورد یک مولد خاص طی دفعات مختلف اسپرم‌گیری، تفاوت‌های زیادی می‌تواند وجود داشته باشد (Rana، 1995).

از آنجا که در فرایند تکثیر مصنوعی ماهی آزاد دریای خزر، ممکن است با صید یک مولد ماده دسترسی به مولد نر مناسب امکان‌پذیر نباشد، برحسب نیاز از یک مولد برای بار دوم اسپرم‌گیری می‌شود. استرس ناشی از تکرار اسپرم‌گیری می‌تواند مشکلاتی را در تولید اسپرم یا کیفیت آن ایجاد نماید (Bobe و Labbé، 2009). طوری‌که اثر تخریبی انواع استرس بر تراکم، مدت زمان و درصد اسپرم‌های متحرک در سایر ماهیان از جمله باس سفید (Rurangwa و همکاران، 2004) و گروهی از آزاد ماهیان نیز به اثبات رسیده است (Wagner و همکاران، 2002).

ارزیابی مناسب کیفیت اسپرم جزء عوامل کلیدی در روند تولید موفق ماهی محسوب می‌گردد (Alavi و همکاران، 2006). در مطالعه حاضر ، تغییرات عوامل کیفی اسپرم ماهی آزاد دریای خزر همچون تراکم اسپرم، درصد اسپرماتوکریت (Rurangwa و همکاران، 2004)، حجم اسپرم، میزان تحرک و مرفولوژی اسپرماتوزوئید (درصد اسپرماتوزوئیدهای غیرطبیعی) و اثر آن بر روی درصد لقاح، چشم‌زدگی، تخم‌گشایی و در پایان بازماندگی لاروهای حاصل در طی اسپرم‌گیری‌های مکرر مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال 1388 در مرکز بازسازی ذخائر آزادماهیان شهید باهنر کلاردشت انجام شد. در مرحله اول 9 قطعه مولد نر 3 ساله پرورشی و 5 قطعه مولد ماده ماهی آزاد دریای خزر پس از صید و بیهوشی با MS_{222} (به میزان 100 ppm)، بیومتری شده و طول کل (سانتی‌متر) و وزن مولدین (گرم) به‌صورت جداگانه ثبت شد (در این مرحله به دلیل کم بودن میزان تخمک استحصالی از 5 عدد مولد ماده استفاده شد، درحالی‌که مراحل دوم و سوم در هر مرحله از 3 عدد مولد ماده استفاده و در هر مرحله از لقاح از مولدین ماده یکبار استفاده گردید). ابتدا استحصال تخمک از مولدین ماده با روش مالش شکم (Stripping) صورت گرفت و تخمک‌های هر مولد ماده پس از توزین، جهت یکنواختی کیفیت آنها در یک تشتک پلاستیکی با هم مخلوط و به 3 قسمت مساوی تقسیم شدند. در مرحله اول از همه مولدین نر (9 مولد) به‌صورت جداگانه اسپرم‌گیری صورت گرفت و این 9 مولد به‌دلیل ثبت بیومتری و بررسی دقیق‌تر با علامت‌گذاری از هم جدا شده و در 3 گروه 3 تایی در حوضچه‌های جداگانه نگهداری شدند. میزان 1/5 میلی‌لیتر از اسپرم‌های استحصال شده از هر مولد نر به‌صورت جداگانه به‌منظور آزمایشات تعیین

Archive of SID

www.SID.ir

کیفیت اسپرم به آزمایشگاه انتقال داده شد. اسپرم استحصالی از هر 9 مولد نر به‌دلیل همسن بودن مولدین و همچنین ایجاد شرایط یکسان، با هم مخلوط شده و عمل لقاح با اضافه کردن اسپرم‌ها به تخمک‌های هر 3 ظرف انجام شد. پس از آبگیری تخم‌ها و سفت شدن آنها، به 3 سینی در یک تراف در سالن انکوباسیون انتقال یافتند تا روند انکوباسیون در آنها بررسی گردد. از یک هفته بعد، این مولدین مرتباً مورد معاینه قرار گرفتند تا در صورت آمادگی، اسپرم‌گیری شوند. 14 روز بعد، همه 9 عدد مولدین‌نر علامت‌گذاری شده، از حوضچه صید شده و دوباره اسپرم‌گیری از مولدین اولیه صورت گرفت. همزمان 3 قطعه مولد ماده (برای اولین بار) آماده تکثیر نیز به منظور فرآیند لقاح، تخم‌کشی و پس از مخلوط کردن به 3 قسمت مساوی تقسیم و در 3 ظرف ریخته شد. مخلوط اسپرم‌های استحصالی مرحله دوم نیز با تخمک‌های استحصالی مخلوط شده و عمل لقاح صورت گرفت. قبل از لقاح حدود 1 سی‌سی (به‌دلیل کاهش حجم اسپرم در این مرحله) از اسپرم‌ها قبل لقاح برای مطالعه کیفیت آن در ظرف نمونه‌گیری (ویال پلاستیکی) ریخته شد و مجدداً به آزمایشگاه ارسال شد. 27 روز بعد از مرحله دوم، دوباره عملیات قبلی تکرار شد و نمونه‌های اسپرم در این مرحله نیز به آزمایشگاه منتقل شد.

پس از عمل هم‌دمایی در سالن انکوباسیون، تخم‌های لقاح یافته در هر مرحله به‌طور کاملاً تصادفی بر حسب شماره‌های معین شده به سینی‌های چشمه ریز منتقل شدند. به‌دلیل اثرات زیانبار نور بر تخم‌ها، سینی‌ها تا زمان رسیدن لاروها به مرحله تغذیه فعال به‌صورت سرپوشیده نگهداری شدند. در محل ورودی آب نیز یک فیلتر قرار داده شد تا از ورود مواد ناخواسته و گل و لای جلوگیری شود.

2 روز بعد از لقاح تا بعد از مشاهده اولین تفریخ تخم‌ها، تخم‌ها بوسیله مالاشیت گرین جهت پیشگیری از قارچ‌زدگی ضدعفونی شدند. میزان مالاشیت گرین مورد استفاده برای هر تراف 1 گرم در لیتر بود که تخم‌ها یک روز در میان به‌مدت 45 الی 60 دقیقه در معرض این ماده قرار می‌گرفتند (روش حمام طولانی، شرایط معمول کارگاه).

6 الی 7 روز پس از لقاح، به منظور تعیین درصد لقاح در تیمارها، در حدود 80 تخم، پس از شفاف‌سازی بوسیله محلول شفاف‌کننده شامل فرمالدهید 5 درصد + اسیداستیک 4 درصد (لرستانی، 1383)، بررسی و نمونه‌های دارای کمربند عصبی مورد شمارش قرار گرفتند. میزان لقاح تخمک‌ها مطابق معادله 1 محاسبه و ثبت شد (Bromage و Cumaranataunga، 1988).

معادله :1

100× (تعداد کل تخم‌ها/ تعداد تخم‌های لقاح یافته) = درصد لقاح

حدود 14 روز پس از لقاح، با روش شوک‌دهی، (Aas و همکاران، 1991)، تخم‌های چشم زده از تخم‌های تلف شده مشخص گردید. تخم‌ها از فاصله 20 سانتی‌متری در سینی دیگری تخلیه شده که طی این عمل تخم‌های لقاح نیافته یا تلف شده، سفید شدند. تخم‌های تلف شده با استفاده از پوآر جمع‌آوری و شمارش شدند. تخم‌های چشم زده به دقت شمارش و میزان بازماندگی تخم‌ها تا مرحله چشم‌زدگی از طریق معادله 2 محاسبه گردید.

معادله :2

100× (تعداد تخم‌های لقاح یافته/ تعداد تخم‌های چشم‌زده)= درصد چشم‌زدگی

Archive of SID
www.SID.ir

با تفریخ شدن تخم‌ها و ظهور لارو دارای کیسه زرده (30 تا 35 روز پس از لقاح)، تخم‌های تفریخ نشده با استفاده از پوآر جمع‌آوری شده و پس از شمارش آنها درصد تفریخ از طریق معادله 3 به‌دست آمد (Billard و Gillet، 1981).

معادله :3

درصد تفریخ = (تعداد تخم‌های چشم‌زده/تعداد لارو)×100

پس از اینکه لاروها تقریباً دوسوم کیسه زرده خود را جذب کردند (55 تا 60 روز پس از لقاح)، با شمارش لاروهای تلف شده، میزان بازماندگی لارو تا مرحله جذب کیسه زرده محاسبه شد و لاروهای سالم برای تغذیه دستی درون تراف ریخته شدند (Billard و Gillet، 1981).

در پایان هر 3 مرحله حجم اسپرم، تحرک، مورفولوژی اسپرماتوزوئید، میزان اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم اندازه‌گیری و ثبت شد. طوری‌که برای محاسبه حجم اسپرم، مقدار اسپرم به‌دست آمده از هر مولد نر در مرحله اسپرم‌گیری، در داخل لوله سر مخروطی مدرج ریخته و حجم آن برحسب سانتی‌متر مکعب محاسبه گردید (Vladi و همکاران، 2002).

برای بررسی میزان تحرک، اسپرم به نسبت 1:20 (یک حجم اسپرم و 20 حجم محلول) رقیق شد. برای این منظور ابتدا 40Ml سرم فیزیولوژی روی لام ریخته و سپس 2Ml اسپرم به آن اضافه شد. آنگاه با یک لامل با هم مخلوط و پس از تهیه گسترش در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی 400× حرکت اسپرماتوزوئید بررسی شد (Suquet و همکاران، 1992).

برای بررسی مورفولوژی اسپرماتوزوئید، یک قطره اسپرم هموژنیزه در انتهای لام قرار داده و از آن یک گسترش تهیه شد (همانند تهیه گسترشهای خون). گسترش تهیه شده در داخل هود گذاشته شد تا اسپرماتوزوئیدها فیکس شوند. سپس بر روی آن الکل ریخته (متانول) شد تا خشک شود، آنگاه با فوشین (فوشین مورد استفاده در رنگ آمیزی گرم) رنگ‌آمیزی کرده و بعد از 2-1 دقیقه گسترش مربوطه با آب شسته شد و پس از خشک شدن گسترش، 500 عدد اسپرماتوزوئید از نظر شکل در زیر میکروسکوپ با عدسی 100 و روغن ایمرسیون مورد بررسی قرار گرفت. سپس اشکال غیرمتعارف یا غیرطبیعی ثبت شد (ایزدی، 1371).

به‌منظور محاسبه میزان اسپرماتوکریت از اسپرم مولدین هر گروه سنی قبل از مخلوط نمودن آنها، نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌برداری بوسیله لوله میکروهماتوکریت انجام گرفت (Aas و همکاران، 1991؛ Tvedt و همکاران، 2001). سپس نمونه‌ها بوسیله دستگاه میکروسانتریفیوژ (Aas و همکاران، 1991؛ Rakitin و همکاران، 1999؛ Liley و همکاران، 2002) به‌مدت 5 دقیقه و با دور 14000 دردقیقه سانتریفیوژ شدند (Vladi و همکاران، 2002) و بوسیله خط‌کش مخصوص سنجش درصد اسپرماتوکریت، میزان اسپرماتوکریت هر نمونه خوانده شد.

برای شمارش اسپرماتوزوئیدهای جمع‌آوری شده از مولدین، ابتدا آنها رقیق و سپس در لام مخصوص هموسیتومتر قرار داده شد و به‌وسیله میکروسکوپ عمل شمارش انجام شد. تراکم اسپرماتوزوئید از طریق معادله 4 محاسبه گردید (Suquet و همکاران، 1992).

معادله :4

تراکم اسپرماتوزوئید در یک سانتی‌متر مکعب به‌صورت خالص = $x \times 5 \times 10^7$

که x برابر با مجموع اسپرم در 5 خانه لام هموسیتومتر می‌باشد.

برای تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 17 و برای رسم نمودارها از برنامه

Archive of SID

www.SID.ir

Excel 2003 استفاده گردید. با توجه به اینکه داده‌ها وابسته می‌باشند (فاکتورها درون موردی می‌باشند) بنابراین جهت بررسی وجود اختلاف معنی‌دار آماری هر یک ار فاکتورهای اندازه‌گیری شده بین سه مرحله نمونه‌برداری (فاصله زمانی) از آزمون Repeated measures در سطح اطمینان 95 درصد استفاده و سپس با آزمون دانکن (Duncan) گروه‌ها از یکدیگر تفکیک شدند.

نتایج

نتایج حاصل از زیست سنجی 9 قطعه مولد نر ماهی آزاد دریای خزر در جدول 1، 11 قطعه مولد ماده ماهی آزاد دریای خزر در جدول 2 و کیفیت اسپرم مولدین نر در جدول 3 آمده است.

جدول 1- زیست‌سنجی مولدین نر ماهی آزاد پرورشی مورد استفاده در تحقیق

مولد نر	طول کل (سانتی‌متر)	وزن (گرم)
1	39/3	900/18
2	42/0	1000/15
3	37/0	700/25
4	42/3	1000/0
5	38/0	700/0
6	41/4	950/0
7	40/0	900/35
8	35/6	750/20
9	38/3	900/0

جدول 2- زیست‌سنجی مولدین ماده ماهی آزاد پرورشی مورد استفاده در تحقیق

مولد ماده	طول کل (سانتی متر)	وزن (گرم)	وزن تخم استحصالی (گرم)	تعداد تخم در یک گرم
1	39/1	1000/0	106/10	7
2	33/5	600/18	78/0	7/3
3	38/1	750/0	83/0	8
4	44/3	1200/0	110/0	7/2
5	35/0	1000/0	100/25	7
6	41/0	900/25	85/33	7/1
7	32/3	650/0	80/0	8
8	36/0	1000/31	94/39	7/2
9	38/4	1100/0	110/0	7
10	42/1	1000/0	85/0	7/4
11	39/0	900/0	78/12	7/2

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 3- میانگین بررسی کیفیت اسپرم مولدین نر ماهی آزاد پرورشی در 3 مرحله نمونه‌گیری

پارامتر / مرحله نمونه‌گیری	مرحله اول	مرحله دوم	مرحله سوم	$F_{(2,4)}$
تراکم اسپرم (میلیون در میلی‌متر مکعب)	38/83 ±1/07	42/9 ±10/07	39/03±0/74	0/47
اسپرماتوکریت (درصد)	41/67 ±5/56	52/67 ±12/74	41/0± 2	0/241
حجم اسپرم (میلی‌لیتر)	6/67 ±1/76	2/83 ±0/76	2/5 ± 0/5	12/45
تحرک اسپرماتوزوئید (ثانیه)	20/33 ±1/16	17±1	12 ± 2/65	95/313
مورفولوژی اسپرماتوزوئید (درصدناجورها)	13/33 ±1/53	21/67±4/16	35/33 ± 3/51	23/213

جدول 4- اطلاعات مربوط به نتایج حاصل از تکثیر مصنوعی در 3 مرحله نمونه‌گیری

پارامتر / مرحله نمونه‌گیری	مرحله اول	مرحله دوم	مرحله سوم	$F_{(2,4)}$
درصد لقاح	97/33±1/53	93/33 ± 4/16	75 ± 6/25	19/686
درصد چشم‌زدگی	93/67 ±1/53	93 ± 3	77/33 ± 11/02	5/938
درصد تخم‌گشایی	94/67 ±0/58	90/67 ± 3/51	72 ± 16/7	4/272
درصد بازماندگی	91± 4/58	93/67±1/53	83/33 ± 2/08	6/475

طبق آزمون کرویت موخلی[1] و با توجه به جدول آنالیز واریانس برای فاکتور درون موردی مراحل سه گانه اسپرم‌گیری، مقدار F به‌دست آمد. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌دار آماری بین سه مرحله اسپرم‌گیری از نظر فاکتورهای حجم اسپرم، تحرک و مورفولوژی اسسپرم وجود دارد ($P\leq 0/05$). با توجه به آزمون LSD مشخص شد که بین مرحله اول و دوم از نظر حجم اسپرم، مرحله اول - مرحله دوم، مرحله اول- مرحله سوم و مرحله دوم- مرحله سوم به‌صورت دو به دو از نظر فاکتور تحرک اسپرم و مرحله اول و سوم از نظر مورفولوژی اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد. در حالی که طبق آزمون‌های فوق اختلاف معنی‌دار آماری بین سه مرحله اسپرم‌گیری از نظر فاکتورهای درصد چشم‌زدگی، درصد تخم‌گشایی و درصد بازماندگی لارو وجود نداشت ($P>0/05$). اما با توجه به آزمون LSD مشخص شد که بین مراحل دوم و سوم از نظر درصد بازماندگی لارو اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد (جدول 4).

طبق آزمون کرویت موخلی و با توجه به جدول آنالیز واریانس برای فاکتور درون موردی مراحل سه گانه اسپرم‌گیری، مقدارF به‌دست آمد. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌دار آماری بین سه مرحله اسپرم‌گیری از نظر فاکتور درصد لقاح وجود دارد ($P\leq 0/05$). با توجه به آزمون LSD مشخص شد که بین مرحله اول و سوم از نظر درصد لقاح اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد. در حالی‌که طبق آزمون‌های فوق اختلاف معنی‌دار آماری بین سه مرحله اسپرم‌گیری از نظر فاکتورهای درصد چشم‌زدگی، درصد تخم‌گشایی و درصد بازماندگی لارو وجود نداشت ($P>0/05$). اما با توجه به آزمون LSD مشخص شد که بین مراحل دوم و سوم از نظر درصد بازماندگی لارو اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد (جدول 4).

1- Mauchly's test of Sphericity

Archive of SID

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به‌دست آمده، اسپرم‌گیری‌های مکرر پس از رسیدگی جنسی، روی میزان درصد تحرک و طول دوره تحرک اسپرم تأثیر منفی می‌گذارد. این نتیجه روی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Buyukhatipoglu و Holtz، 1984) و تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) (دادرس، 1388) به اثبات رسیده است.

با توجه به نتایج حاصله، با مشاهده جدول 3 (میزان تراکم و درصد اسپرماتوکریت در 3 مرحله اسپرم‌گیری) میانگین درصد اسپرماتوکریت در مرحله اول 41/67 و در مرحله دوم 52/67 درصد و میانگین میزان تراکم آن به‌ترتیب 38/83 و 42/9 میلیون در میلی‌متر مکعب بود، اما این دو فاکتور در 3 مرحله اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ($P>0/05$). در صورتی‌که وقتی فاصله اسپرم‌گیری افزایش یافت، حجم و تحرک اسپرم کاهش معنی‌داری نشان داد و به‌ترتیب از 1/76 ± 6/67 به 0/5± 2/5 میلی‌لیتر و از 1/16± 20/33 به 2/65±12 ثانیه رسید.

نتایج نشان داد که با پیش رفتن فصل تولیدمثل، اسپرماتوکریت، تحرک و حجم اسپرم کاهش می‌یابد. در بررسی Munkittrick و Moccia (1987) روی منی قزل‌آلای رنگین‌کمان نتایج مشابهی در خصوص اسپرماتوکریت، تحرک اسپرم به‌دست آمد. در این بررسی با افزایش غلظت اسپرم پارامترهای کیفی اسپرم از قبیل تحرک اسپرماتوزوآ، درصد سلول‌های متحرک، حرکت رو به جلو و مستقیم اسپرماتوزوآ کاهش یافت. مشابه این نتیجه توسط Babiak و همکاران (2006) روی ماهی *Hippoglossus hippoglossus* به‌دست آمد.

در این بررسی با کاهش فاصله زمانی در اسپرم‌گیری‌ها، حجم و مدت زمان تحرک اسپرم افزایش و غلظت اسپرم کاهش یافت. مشابه این نتیجه روی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Buyukhatipoglu و Holtz، 1984) و ماهی turbot (Suquet و همکاران، 1992) به‌دست آمد.

تغییرات سالیانه خصوصیات اسپرم قزل‌آلاهای جوان در طول فصل تولید مثل توسط Aral و همکاران (2005) بررسی شد و در این مطالعه نمونه‌برداری هر 15 روز یک‌بار صورت گرفت. در طول فصل تولیدمثل، درصد سلول‌های فعال اسپرم به‌طور معنی‌داری بهبود یافت. نتایج تحقیق حاضر نیز در ارتباط با افزایش زمان تحرک در طول دوره بررسی، یافته‌های این تحقیق را تائید می‌نماید.

حسینی و همکاران (1387) در تحقیق مشابهی روی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نشان دادند که در سن 3^{+} سالگی که غلظت اسپرم کاهش می‌یابد، فواصل بین اسپرم‌گیری، تأثیر خود را واضح‌تر نشان می‌دهد و نتیجه آن، حصول اختلاف معنی‌دار در میزان اسپرماتوکریت در تیمارهای متفاوت اسپرم‌گیری می‌باشد. در این سن، زمانی که فاصله اسپرم‌گیری‌ها به 14 روز یک‌بار می‌رسد، فرصت توان تولید بالای اسپرم و افزایش غلظت اسپرم به مولد داده می‌شود که نتیجه آن کاهش میزان تحرک است، ولی زمانی که فواصل بین اسپرم‌گیری به 7 روز در میان کاهش می‌یابد، مولدین این سن دیگر قادر به اصلاح کیفیت اسپرم خود جهت حصول درصد چشم‌زدگی بالا نمی‌باشند. اما زمانی که فواصل اسپرم‌گیری در این سن به 10 روز در میان می‌رسد، افزایش میزان غلظت اسپرم، اثر کاهش تحرک را در لقاح پوشش داده است که نتیجه آن عدم اختلاف معنی‌دار تیمارهای 14 روز و 10 روز در میان اسپرم‌گیری است. در تحقیق حاضر نیز نتایج مشابه تحقیق فوق بوده است.

اثر نسبت اسپرم به تخمک و مدت زمان تماس گامت‌ها با هم بر روی موفقیت لقاح در ماهی *Gadus morhua* توسط Ian و همکاران (2009)

Archive of SID
www.SID.ir

مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیقات نشان داد که بین میزان اسپرماتوکریت و غلظت اسپرم (بوسیله سنجش با هموسایتومتر)، یک ارتباط خطی، مثبت و معنی‌داری وجود دارد (P=0/001، r=0/817). همچنین این محققان گزارش نمودند که سنجش اسپرماتوکریت به‌عنوان پارامتری در سنجش غلظت اسپرم، یک روش مطمئن و سریع در ارزیابی غلظت اسپرم این گونه می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر یافته‌های این تحقیق را تأیید می‌کند.

ارتباط بین وضعیت بدن، پارامترهای کیفی اسپرم و موفقیت لقاح در قزل‌آلای رنگین‌کمان در سال 2006 توسط Bozkurt بررسی شد. نتایج نشان داد که بین تحرک و میزان لقاح (r=0/944, P<0/01) ارتباط مثبت و معنی‌داری برای همه نمونه‌ها مشاهده شد (r= 0/742, P<0/01). نتایج تحقیق حاضر یافته‌های تحقیق فوق را در مورد رابطه بین تحرک و میزان لقاح و به دنبال آن چشم‌زدگی را تائید می‌نماید. در تحقیق حاضر بالاترین درصد لقاح در مرحله اول (97/33 درصد) بوده که تحرک اسپرم 20/33 ثانیه اندازه‌گیری شد اما کمترین درصد لقاح در مرحله آخر اسپرم‌گیری (75 درصد) و با مدت زمان تحرک 12 ثانیه مشاهده شد. مشابه این نتیجه در بررسی دادرس (1388) به‌دست آمد.

این تحقیق نیز همانند تحقیقات گذشته که روی سایر ماهیان انجام شد، بهبود کیفیت اسپرم در اولین مرحله اسپرم‌گیری را با توجه به کاهش حجم و تحرک اسپرم در مرحله دوم و سوم اسپرم‌گیری، تأیید کرده و بهتر است در صورت استفاده از مولدین پرورشی ماهی آزاد دریای خزر از آنها فقط یک‌بار اسپرم‌گیری شود. نتایج این تحقیق می‌تواند راه‌کار مناسبی جهت افزایش کارایی تکثیر مصنوعی ماهی آزاد دریای خزر و افزایش بازماندگی لاروهای حاصله از آنها در جهت احیاء بازسازی ذخائر این گونه ارزشمند باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان و کلیه کارکنان مرکز تکثیر، پرورش و بازسازی ذخایر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت نهایت تشکر و سپاس را داریم.

منابع

1- ایزدی، ع.، 1371. بررسی اسپرم تاسماهیان و طرز نگهداری اسپرم در ماهیان مختلف. پایان‌نامه کارشناسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی کرج. 93 صفحه.

2- حسینی، ش.، خارا، ح.، لرستانی، ر.، 1388. اثر فواصل اسپرم گیری مولدین سنین مختلف قزل آلای رنگین کمان بر تحرک اسپرم، اسپرماتوکریت و چشم‌زدگی تخم. مجله شیلات، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر، سال سوم، شماره سوم، صفحات 41 تا 50.

3- دادرس، ح.، 1388. تأثیر اسپرم‌گیری مجدد بر روی برخی پارامترهای اسپرم‌شناختی تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشگاه آزاداسلامی واحد لاهیجان، 121 صفحه.

4- لرستانی، ر.، 1383. اثر سن مولد نر و محلول‌های تقویت کننده بر مدت زمان تحرک اسپرم و میزان باروری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع‌طبیعی و علوم دریایی نور، 67 صفحه.

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

6.Alavi, S.M.H., Cosson, J., and Kazemi, R., 2006. Semen characteristics in *Acipenser persicus* in relation to sequential stripping. *Applied Ichthyology* 22, 400-405.

Archive of SID
www.SID.ir

7.Aral, F., Sahynoz, E., and Dogu, Z., 2005. Annual changes in sperm characteristics of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) during spawning season in Ataturk Dam Lake, Sanliurfa, Turkey. *Journal-of-Animal-and-Veterinary-Advances* 4(2), 309-313.
8.Babiak, I., Ottesen, R., Rudolfsen, O., and Johnsen, S., 2006. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season. *Theriogenology. Res*. 65, 1587–1604.
9.Billard, R., and Gillet, C., 1981. Aging of eggs and temperature potentialization of micropollutant effecs of the aquatic medium on trout gamets. *Cah. Lab. Hydrobiol. Montreau*. 12, 35-42.
10.Bobe, J., and Labbé, C., 2009. Egg and sperm quality in fish .*General and Comparative Endocrinology* 165, 535-548.
11.Bozkurt, Y., 2006. Relationship between body condition and spermatological properties in scaly carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Journal-of-Animal-and-Veterinary-Advances* 5(5), 412-414.
12.Bromage, N.R., and Cumaranataunga, R., 1988. Egg production in the rainbow trout, In Recent advances in Aquaculture, Vol. 3., Muir, J.F, R.J., Robert, Eds, pp. 63-139.
13.Buyukhatipoglu, S., and Holtz, W., 1984. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture* 37, 63-71.
14.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 River Press, pp.161-186.
15.Cosson, J., Linhart ,O., Mims, S.D., Shelton, W.L., and Rodina, M., 2000. Analysis of motility parameters from paddlefish (*Polyodon spathula*) and shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platorynchus*) spermatozoa. *Fish Biology* 56, 1348–1367.
16.Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S., and Schmalchausen, O.I., 1993. Sturgeon fishes. In: Developmental Biology and Aquaculture, Springer-Verlag, Berlin, pp. 67–71.
17.Hajirezaee, S., Mojazi Amiri, B., and Mirvaghefi, A.R., 2009. Effects of stripping frequency on semen quality of endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*. *Animal and Veterinary Sciences* 4, 65-71.
18.Ian, A.E., Matthew, A.T., and Litvak, K., 2009. The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Aquaculture* 286, 89–94.
19. 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./J. Can. Sci. Halieut. Aquat*. 59 (1), 144-152.
20.Linhart, O., Cosson, J., Mims, S.D., Shelton, W.L., and Rodina, M., 2002. Effects of ions on the motility of fresh and demembranated Paddlefish, *Polyodon spathula* spermatozoa. *Reproduction* 124, 713-719.
21.Munkittrick, K.R., and Moccia, R.D., 1987. Seasonal changes in the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: Effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constituents. *Aquaculture* 64(2), 147-156.
22.Piros, B., Glogowski, J., Kolman, R., Rzemieniecki, A., Domagala, J., Horvath, A., Urbanyi, B., and Ciereszko, A., 2002. Biochemical characterization of Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*, and starlet, *Acipenser ruthenus*, milt plasma and spermatozoa. *Fish Physiology* and *Biochemistry* 26, 289-295.
23.Rakitin, A., Ferguson, M., and Trippel, E., 1999. Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic Cod *(Gadus morhua)*: Correlation and variation during the spawning season. *Aquaculture* 170, 349-358.
24.Rana, K.J., 1995. Preservation of gametes. Cambridge: Cambridge University Press. Brood Stock Management and Egg and Larvae Quality, pp. 53-76.
25.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.

Archive of SID
www.SID.ir

26.Suquet, M., Omnes, M.H., Normant, Y., and Fauvel, C., 1992. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 101(1-2), 177-185.
27.Trippel, E.A., and Neilson, J.D., 1992. Fertility and sperm quality of virgin and repeat-spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*) and associated hatching success. *Fisheries and Aquatic Scienc,* 49, 2118-2127.
28.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.
29. 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.
30.Wagner, E., Arndt, R., and Hilton, B., 2002. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout brood stock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture* 211, 353-366.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Fisheries, Islamic Azad University, Azadshahr Branch
Vol. 5, No. 2, Mey 2011

Effect of repetitive sperm stripping on some spermatology parameters, fertilization rate and the incubation trend in farmed Caspian brown trout (*Salmo trutta aspius*, Kessler 1877)

H. Khara[1], S. Shamspour[2], M. Rezvani[2], M. Ahmadnezhad[1], M. Rahbar[1] and S.S. Mousavi[1]

[1]Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resource, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran,
[2]Restocking of Salmonidea Center of Shahid Bahonar Kelardasht, Kelardasht, Iran,
[4]Inland Water Aquaculture Research Center, Bandar Anzali, Iran.

Abstract

The survey was carried out at the Shahid Bahonar Kalardasht Salmonids Reproduction Center (KSRC) during spawning season at 2009. A number of nine mature males (three years old) and 11 female Caspian brown trout,grown in the Salmonids Reproduction Center, were used. In the first stage all of male brood stocks (9 male) striped sperm sampling separately. Fertilization was made with each group's sperm mixture and striped eggs in part of the five female and then eggs hardness process, transferred to the three trays in a incubation trays then the incubation process trends were evaluated. 14 days after the first stage, the second stage of sperm stripping occurred and 27 days after the second stage, third stage of sperm stripping as well as making first phase sperm stripping was implemented for each stage group of the three females. At the end of each three stages of sperm stripping, sperm density, spermatocrit percentage, sperm volume, sperm motility and morphology of spermatozoa (percentage of abnormal spermatozoa) were recorded and investigated. Its effect on fertilization rate, eyed eggs, hatching rate and larvae survival during repetitive sperm extraction were measures. The results showed that there were significant differences between the volume, motility, sperm morphology and fertilization rate during third phase of the study (P<0.05). The highest fertilization rate observed in the first stage of sperm extraction (97.33±1.53%) and lowest fertilization rate observed in the third stage of sperm extraction (7.25±6.25%). In this study, sperm density, spermatocrit, the percentage of eyed eggs, hatching and larvae survival in all the third stage was not significantly different (P>0.05). However, due to LSD test, percent survival of larvae had differences in stage 2 and 3.

Keywords: Repetitive sperm stripping; Fertilization rate; Caspian brown trout.

*Corresponding Authors; Email: h_ khara1974@yahoo.com

www.SID.ir