

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

شقایق رضا خانی^{(۱)*}؛ علی صادق پور^(۱)؛ حسین خارا^(۲)؛ رضا لرستانی^(۲)

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 پذیرش: فروردین ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۱

چکیده

کیفیت مناسب اسپرم که مهمترین مشخصه آن تحرک می باشد، می تواند سبب افزایش لقاح گردد. از آنجایی که کیفیت اسپرم ها و تخمک ها در طول دوره تکثیر به مرور کاهش می یابند و این مسئله سبب پایین آمدن کیفیت کار تکثیر خواهد شد، تحقیق حاضر به منظور افزایش کارایی تولید مثل با استفاده از فعال کننده ها در اواسط فصل تکثیر انجام گرفت. بدین منظور ۱۴ محلول فعال کننده 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 فعال کننده و همچنین آب مقطر و آب کارگاه به عنوان شاهد، بر مدت زمان تحرک اسپرم، میزان لقاح، چشم زدگی و تخم گشایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در مورد فاکتور تحرک اسپرم، محلول های فعال کننده اسپرم اختلاف معنی داری در مقایسه با هم و با گروه شاهد داشتند. بدین صورت که فعال کننده ۱ با ترکیب CaCl_2 ، $\text{NaCl} = 6 \text{ gr/L}$ ، $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0.735 \text{ gr/L}$ و $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 = 4/50 \text{ gr/L}$ با $\text{pH} = 7/6$ و فعال کننده ۶ با ترکیب $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0.735 \text{ gr/L}$ ، $\text{NaCl} = 7/305 \text{ gr/L}$ با $\text{pH} = 7/7$ 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 محلول های فعال کننده اسپرم مورد تحقیق، تأثیرات معنی دار 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.

۱. مقدمه

آبزی پروری قرن هاست 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 بی رویه، 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، می تواند ما را در دستیابی به تقاضای روز افزون و در حال رشد آبزی پروری در جهان کمک کند (۱۹). یکی از عوامل مهم در فرآیند لقاح، اسپرم است. بنابراین کیفیت مناسب اسپرم که مهم ترین مشخصه آن تحرک می باشد، می تواند 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 می گردد. تحقیقات جدید بر روی مواد تناسلی ماهی کپور بخصوص اسپرم نشان داده است که استفاده از فعال کننده ها مانند محلول نمکی موجب حفظ ساختار تاژک اسپرم شده و در نتیجه زمان حرکت اسپرم افزایش می یابد (۱). در مایع منی ماهی قزل آلا و خاویاری عدم تحرک اسپرم به علت وجود یون پتاسیم (k^+) می باشد (۵، ۲۵). مدت زمان تحرک اسپرم، درصد سلول های متحرک و سرعت تحرک اسپرماتوزوآ، با توجه به گونه ماهی، دما، ترکیب رقیق کننده و همچنین نسبت رقیق سازی متفاوت می باشد (۱۵) و غلظت داخلی یون کلسیم همراه با شروع تحرک اسپرم افزایش می یابد که این نتیجه جریان یون کلسیم خارجی به داخل سلول ها است. افزایش یون کلسیم خارجی می تواند تحرک اسپرماتوزوآ را القاء کند (۱۷) پس می توان عنوان نمود که کیفیت منی یکی از فاکتورهایی است که می تواند درصد لقاح را تحت تأثیر قرار دهد و می توان از آن به عنوان توانایی برای باروری تخم ها نام برد.

بررسی اثر سن و تعیین تاثیر ترکیب یونی و بیوشیمیایی اسپرم بر روی کارایی تکثیر مصنوعی ماهی آزاد دریای خزر توسط متاجی در سال ۱۳۸۸ بررسی 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 داد که 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 اسپرم ها و تخمک های ماهیان پرورشی در مقایسه با وحشی از کیفیت پایین تری برخوردار دارند و حجم و غلظت و برخی دیگر از فاکتورهای آنها افت چشم گیری می یابد و این مسئله سبب افت کیفیت تکثیر خواهد شد، واضح است که اجرای این تحقیق می تواند گامی در جهت بهبود فرآیند تکثیر و انجام موفق تر آن در فصل تولید مثل باشد. در این تحقیق سعی خواهد شد اثر محلول های مختلف فعال کننده نمکی اسپرم بر میزان درصد لقاح ماهی آزاد پرورشی دریای خزر بررسی شود تا با یافتن فعال کننده مناسب برای اسپرم این ماهی ارزشمند که یکی از گونه های 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 ۱۳۹۰ و در مرکز بازسازی ذخایر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت واقع در غرب استان مازندران انجام شد. جهت آماده سازی محلول های فعال کننده مختلف، ترکیبات مواد آزمایشگاهی مربوط به هر یک، بر حسب گرم در لیتر به دقت توزین شدند. سپس مواد مربوط به هر فعال کننده در بشر جداگانه ای ریخته شده و بوسیله دستگاه همزن مغناطیسی،

تصادفی انتخاب شدند. در نهایت ۵ فعال کننده که باعث بیشترین مدت زمان تحرک شدند، ۲ محلول فعال کننده تصادفی و محلول های شاهد (آب کارگاه، آب مقطر) جهت انجام لقاح ها بکار رفتند. بعد از ساخت محلول های فعال کننده، EC محلول ها با استفاده از دستگاه مدل Metrohm/644 Conductom- 211 HANNA ساخت کشور آلمان 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 ماهی های ماده را بوسیله عصاره گل میخک (150ppm) بیهوش نموده و تخمک های مورد نیاز جهت لقاح تهیه گردید. پس از بیهوش کردن مولدین نر در ابتدا بطور جداگانه اسپرم گیری شدند استحصال اسپرم مستقیماً از سوراخ تناسلی مولدین نر بعد از خشک کردن اطراف سوراخ تناسلی انجام شد. جهت انجام لقاح ها، به دلیل احتمال عقیم بودن و یا کیفیت نامناسب اسپرم در بعضی از مولدین و یا کیفیت بالای اسپرم در بعضی دیگر، اسپرم های مولدین نر با هم مخلوط گردید (۱۴).

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

از میان محلول های فعال کننده 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 فعال کننده های مختلف و گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفت (۸). یک قطره اسپرم را روی لام در زیر میکروسکوپ قرار داده و جهت فعال سازی آن، یک قطره آب مقطر به عنوان گروه شاهد استفاده شد و همزمان بوسیله کرنومتر مدت زمان تحرک ثبت گردید (۱۱، ۱۰، ۶). جهت سنجش اثر فعال کننده های متفاوت اسپرم بر مدت زمان تحرک اسپرم، همانند گروه شاهد عمل شد با این تفاوت که جهت فعال سازی اسپرم به جای آب، از فعال کننده ها استفاده گردید (۱، ۱۰، ۶) و مدت زمان تحرک اسپرم در گروه شاهد و در تمامی فعال کننده ها در سه تکرار ثبت گردید. ۲ محلول فعال کننده دیگر (محلول های شماره ۳ و ۵) نیز برای تکمیل نتایج بصورت

جدول ۱: ترکیبات محلول های انتخاب شده جهت انجام لقاح ها بر حسب گرم بر لیتر

pH	مواد								محلول
	NaHCO ₃	MgSO ₄ .7H ₂ O	KCl	Glycine	Tris	CO(NH ₂) ₂	CaCl ₂ .2H ₂ O	NaCl	
۷/۷	آب کارگاه								گروه شاهد
۷	آب مقطر								
۷/۶	-	-	-	-	-	۴/۵۰	.۲	۶	محلول ۱
۸/۴	-	-	-	-	۲/۴۲۲	-	-	۵/۵۴	محلول ۲
۹	-	-	-	-	۲/۴۲۲	-	-	۷/۳۰۵	*محلول ۳
۹	-	۰/۳۲	۰/۲۳	۰/۲۳	-	-	.۲۶۴	۹/۰۵۸	محلول ۴
۸	۸/۴۰۱	-	-	-	-	-	-	-	*محلول ۵
۷/۷	-	-	-	-	-	-	۰/۷۳۵	۷/۳۰۵	محلول ۶
۹	-	-	۰/۲	۰/۲	-	-	۰/۳	۹	محلول ۱۱

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

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 (۱۱، ۱۴، ۲۳). طول دوره تحرک موجی اسپرماتوزوئیدها تا پایان تحرک گروهی و موجی شکل آنها در نظر گرفته شد. این سنجش ها برای فعال کننده های 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 تخم های لقاح یافته، ۱ تراف و ۳ سینی بکار رفت. هر سینی توسط نئوپلاست به ۱۲ قسمت مساوی تقسیم شد و تمام قسمت های تقسیم بندی شده سینی ها به طور تصادفی شماره گذاری شدند و تخمک های لقاح یافته، پس از جذب آب، بطور کاملا تصادفی بر حسب شماره های معین شده، در جایگاه خود در سینی ها قرار گرفتند. از ۲ روز بعد از لقاح تا بعد از مشاهده اولین چشم زدگی تخم ها، تخم ها بوسیله مالاشیت گرین جهت پیشگیری از قارچ زدگی ضد عفونی شدند. میزان مالاشیت گرین مورد استفاده برای هر تراف ۱ گرم در لیتر بود که تخم ها یک روز در میان به مدت ۴۵ الی ۶۰ دقیقه در معرض این ماده قرار می گرفتند (شرایط معمول کارگاه). برای تعیین درصد لقاح حدود ۱۰۰ عدد تخمک، پس از شفاف سازی بوسیله محلول شفاف کننده^۱، مشاهده شده و نمونه های دارای کمر بند عصبی مورد شمارش قرار گرفتند. میزان لقاح تخمک ها مطابق رابطه ۱ محاسبه شده و ثبت گردید.

$$\text{رابطه ۱ (۱۹): درصد لقاح} =$$

$$100 \times (\text{تعداد کل تخمک ها} / \text{تعداد تخمک های لقاح یافته})$$

به منظور سنجش تاثیر متقابل فعال کننده های نمکی بر روی غلظت های متفاوت و تحرک های متفاوت در اسپرم های مولدین مختلف از ۳ گروه با غلظت های متفاوت اسپرم استفاده شد. اسپرم های 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، مجموعاً ۷ تیمار (فعال کننده های 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 سی سی توسط پیمانان از تخمک های مخلوط شده مولدین ماده جدا گردید و با استفاده از تنظیف، مایع حفره شکمی از تخمک ها جدا گردید. جداسازی مایع حفره شکمی جهت جلوگیری از خطا صورت گرفت زیرا مایع حفره شکمی خود یک فعال کننده اسپرم می باشد (۱۴). سپس هر دسته تخمک را جداگانه در ظروف پلاستیکی متوسط قرار داده و برای هر ظرف، ۳ سی سی اسپرم با استفاده از میکروپیپت برداشته شد و با تخمک های موجود در آن کاملاً مخلوط گردید. به منظور فعال سازی اسپرم و انجام عمل لقاح ۳ سی سی آب مقطر در تیمار گروه شاهد به هر ظرف اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه کاملاً هم زده شد تا لقاح کامل گردد. عمل لقاح در تیمارهای متفاوت فعال کننده نمکی دقیقاً مشابه گروه شاهد انجام شد ولی با این تفاوت که در تیمارهای مربوط به فعال کننده های نمکی، از ۳ سی سی از آن محلول ها به جای آب، جهت فعال سازی اسپرم و تکمیل لقاح استفاده گردید. تخمک های لقاح یافته موجود در ظروف پلاستیکی بعد از شستشو، در آبکش هایی که قبلاً شماره گذاری 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 اسپرم های مولدین بصورت گروه های ۵ تایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

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

سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شده است.

جهت مقایسه گروه 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 نورمورد استفاده در این تحقیق به ترتیب $43/8 \pm 8/93$ و $41/20 \pm 8/07$ سانتی متر بود. کمترین طول کل و طول چنگالی در ماهیان نور به ترتیب ۳۵ و ۳۳ سانتی متر و بیشترین طول کل و طول چنگالی آنها به ترتیب ۵۶ و ۵۲ سانتی متر بود (جدول ۱-۳). همچنین از ماهیان ماده با متوسط طول کل و طول چنگالی به ترتیب $52/4 \pm 15/2$ و $48/8 \pm 14/1$ سانتی متر استفاده شد که حداقل و حداکثر آنها به ترتیب ۳۱-۳۴ و ۶۴-۶۹ بودند (جدول ۲ و ۳).

میانگین و انحراف معیار وزن مولدین نورمورد استفاده در تحقیق $1100 \pm 0/624$ گرم که حداقل و حداکثر آن به ترتیب ۶۰۰ و ۲۰۰۰ گرم بود و در مولدین ماده میانگین و انحراف معیار وزن $1088 \pm 1/32$ گرم با حداقل و حداکثر وزن ۴۰۰ و ۳۵۰۰ گرم بودند (جدول ۲ و ۳). با توجه به آزمون t-test: بین ماهیان مولد نور و ماده از نظر طول کل، طول چنگالی و وزن بدن اختلاف معنی دار آماری مشاهده نگردید ($P > 0/05$).

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

رابطه ۲ (۲): درصد چشمزدگی =

$100 \times (\text{تعداد تخمکهای لقاح یافته} / \text{تعداد تخمهای چشمزده})$
بعد از جمع آوری تلفات در روز چشمزدگی، تخمهای چشمزده 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 زده 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):

$100 \times (\text{تعداد تخمهای چشمزده} / \text{تعداد لارو}) = \text{درصد تفریخ}$
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 (-Oneway 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

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

فاکتور	حداقل	حداکثر	انحراف معیار \pm میانگین
طول کل (سانتی متر)	۳۵	۵۶	$43/8 \pm 8/93$
طول چنگالی (سانتی متر)	۳۳	۵۲	$41/20 \pm 8/07$
وزن (گرم)	۶۰۰	۲۰۰۰	$1100 \pm 0/624$

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

فاکتور	حداقل	حداکثر	انحراف معیار \pm میانگین
طول کل (سانتی متر)	۳۴	۶۹	$52/4 \pm 15/2$
طول چنگالی (سانتی متر)	۳۱	۶۴	$48/8 \pm 14/1$
وزن (گرم)	۴۰۰	۳۵۰۰	$1088 \pm 1/32$

نتایج آزمون ANOVA نشان داد که بین محلول های فعال کننده مورد بررسی از نظر فاکتور مدت زمان تحرک اسپرم اختلاف معنی داری مشاهده گردید ($P < 0/05$) ($F=596/19P_3=0/00$) (شکل ۱).

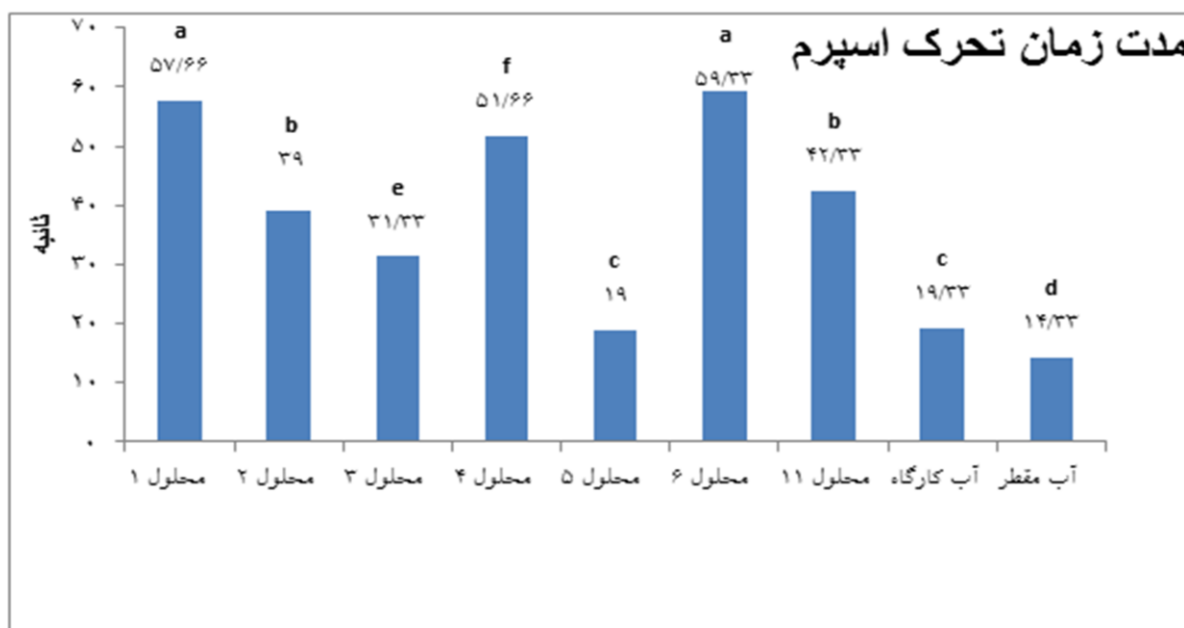
نتایج بدست آمده در مورد مدت زمان تحرک اسپرم در تماس با محلول های مورد نظر نشان داد که، محلول فعال کننده ۱ (۵۷/۶۶ ثانیه) و ۶ (۵۹/۳۳ ثانیه) اختلاف معنی دار آماری با هم نداشته و بالاترین مدت زمان تحرک اسپرم را سبب شدند.

فعال کننده ۴ (۵۱/۶۶ ثانیه) در جایگاه بعدی قرار گرفت. بین فعال کننده ۲ (۳۹ ثانیه) و ۱۱ (۴۲/۳۳ ثانیه) هم اختلاف معنی دار 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 در مورد اثر فعال کننده های تخم ها نشان داد که بین محلول ها تفاوت بر درصد تخم گشایی نشان داد که بین محلول ها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نگردید ($P > 0/05$) (شکل ۴).

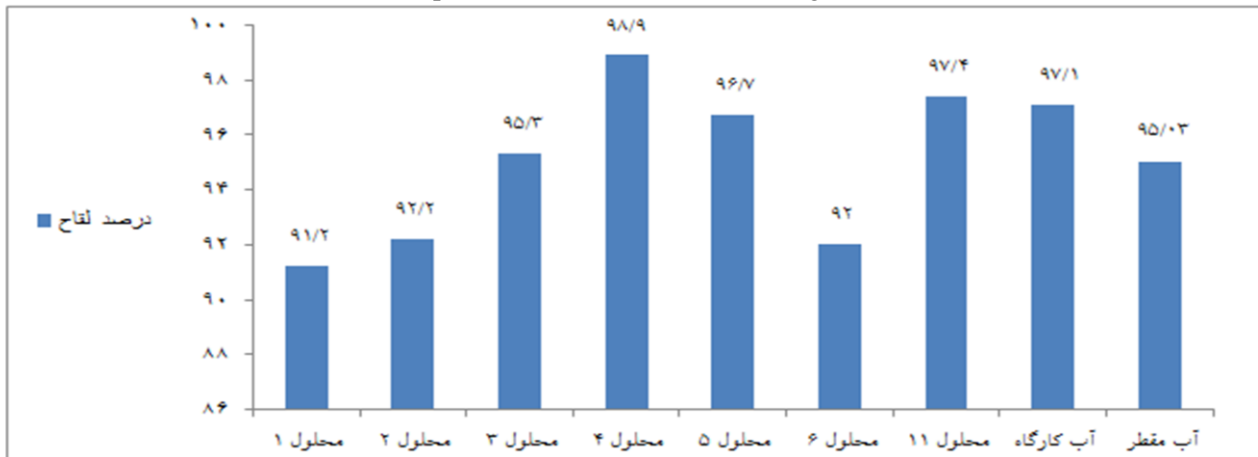
در مورد اثر فعال کننده های مورد بررسی بر میزان چشم زدگی تخم ها نشان داد که بین محلول ها از نظر فاکتور درصد چشم زدگی اندازه گیری شده، اختلاف معنی دار آماری وجود ندارد ($P > 0/05$).

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 ($P > 0/05$) (شکل ۴).



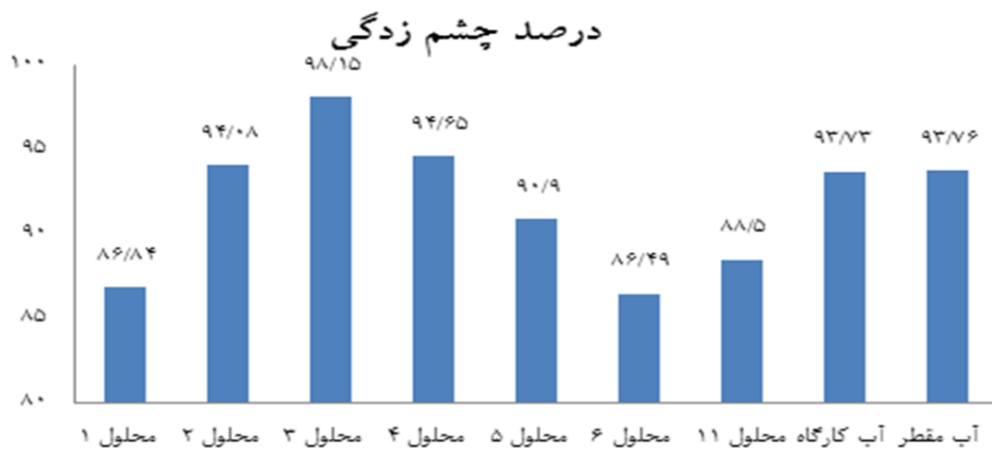
شکل ۱: مدت زمان تحرک اسپرم در حضور هر یک از فعال کننده ها

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



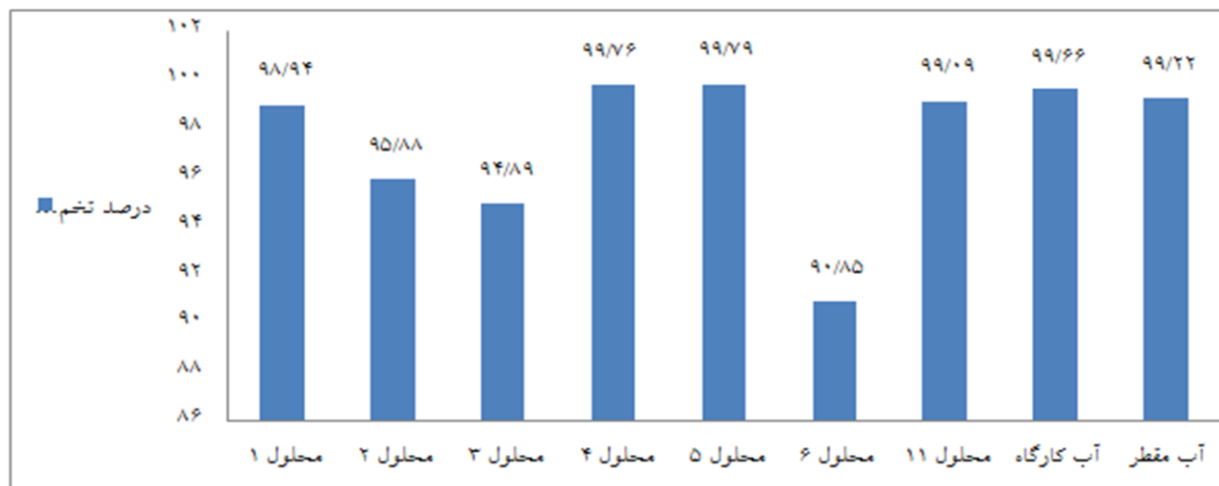
شکل ۲: مقایسه درصد لجاج در حضور هر یک از فعال کننده ها

(F = 1.91 P = 0.121)



شکل ۳: مقایسه درصد چشم زدگی در حضور هر یک از فعال کننده ها

(Chi-Square = 10.59 P = 0.22)



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

۴. بحث

نتایج نشان داد که تمامی فعال کننده های نمکی اسپرم، اثر مثبت و معنی دار متفاوتی بر طول کل مدت زمان تحرک اسپرم در مولدین نر با گروه شاهد نشان داده اند و میزان تحرک بالاتری را سبب گردیدند. این نتیجه در تحقیقات (۵، ۴، ۷، ۴) مشابه بوده است.

با مقایسه ترکیبات فعال کننده های متفاوت دیده می شود که در بین فعال کننده های متفاوت اسپرم ارائه شده دو فعال کننده ۱ و ۶، سبب بالاترین میزان تحرک در مقایسه با دیگر گروه ها شده اند. شاید دلیل این امر این باشد که در این دو فعال کننده، برهم کنش یون ها، فشار اسمزی، pH و ... محیط مناسبتری را برای سلول های اسپرم ماهی آزاد پرورشی دریای خزر در اواسط فصل تکثیر در مقایسه با دیگر فعال کننده ها، ایجاد کرده باشند. اثر تجمعی یون ها 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 فعال کننده ۶، یون کلسیم که یون ضروری جهت آغاز تحرک اسپرماتوزوآ در اسپرم آزاد ماهیان است (۱۸) وجود دارد و این میزان در ترکیب فعال کننده ۶، نسبت به فعال کننده های دیگر مورد تحقیق، بالاتر می باشد. یون کلسیم مهمترین فاکتور جهت القاء و تجدید مدت زمان تحرک اسپرم می باشد (۸). از آنجا که با اضافه نمودن ۱ میلی مول کلسیم به محلول های فعال کننده اسپرم، مدت زمان تحرک اسپرم فراتر از ۳۰ ثانیه به طول می انجامد (۱۷) و از طرفی وجود یون های کلسیم و سدیم نیز اثر تقویت کنندگی بر مدت زمان تحرک اسپرم دارند (۱۰) پس عملکرد مناسبتر فعال کننده های ۱ و ۶ در مقایسه با گروه شاهد، به دلایل مختلف از قبیل وجود یون های متفاوت و مورد نیاز سلول های اسپرم جهت تداوم تحرک، ایجاد یک محیط با فشار اسمزی مناسب و قابل توجه می باشد. در تحقیقی استفاده از فعال کننده ها در لقاح تاس ماهی ایرانی

Acipenser persicus را مورد بررسی قرار دادند (۱). نتایج آن نشان داد که محلول های فعال کننده باعث حفظ ساختار تاژک اسپرم شده و در نتیجه مدت زمان تحرک در مقایسه با آب بالاتر می رود و نتایج آن در تحقیق حاضر مشابه بوده است.

در تحقیقی، با بکارگیری محلول فعال کننده ۶، در اوایل فصل تکثیر، تاثیر فوق العاده محلول ۶ را گزارش کرده بودند (۸). که تحقیق حاضر، علاوه بر تأیید اثر مناسب محلول ۶ بر میزان تحرک اسپرم های آخر فصل مولدین نر، محلول ۱ را نیز یک محلول مناسب جهت افزایش تداوم تحرک برای بکارگیری آن در آخر فصل تکثیر، گزارش می نماید.

تحرک اسپرم در آزاد ماهیان و کپور ماهیان مورد سنجش قرار گرفت (۱۶). نتایج نشان داد، زمانی که یک میلی مول کلسیم به فعال کننده $\text{NaCl}=125\text{g/L}$ ، $\text{Tris}=20\text{Mm}$ با $\text{pH}=9$ اضافه شود، مدت زمان تحرک اسپرم فراتر از ۳۰ ثانیه به طول می انجامد که با مشاهده تقویت کننده ۶ نیز این امر مشخص و واضح است. همچنین گزارش شده که Ca^{++} جهت واکنش آکروزومی و تحرک اسپرم در تاس 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 داد که در بین فعال کننده های متفاوت اسپرم ارایه شده دو فعال کننده ۱ و ۶ سبب بالاترین میزان تحرک در مقایسه با دیگر گروه ها شده اند. که در مورد ماهی آزاد پرورشی دریای خزر نیز بین فعال کننده های متفاوت اسپرم ارایه شده دو فعال کننده ۱ و ۶ سبب بالاترین میزان تحرک شدند.

همچنین در نمودار ۱ اثر فعال کننده ها بر طول کل مدت زمان تحرک اسپرم، دیده می شود که فعال سازی اسپرم بوسیله گروه شاهد (آب کارگاه و آب مقطر)، کمترین مدت زمان تحرک را در مقایسه با سایر فعال کننده ها نشان می دهد.

داد که 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 اسپرم ها به میکروپیل و انجام عمل لقاح را افزایش می دهد که نتیجه آن افزایش میزان لقاح تخمک ها می باشد. 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 می تواند اثرات کاهش تحرک را در لقاح جبران کند (۱۵). نتایج این گزارش را بوضوح می توان در مقایسه گروه های متفاوت این تحقیق، درک نمود. با مقایسه نتایج میزان چشم زدگی تخمک ها، 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.

در روش های قدیمی لقاح مصنوعی، به جای فعال کننده از آب استفاده می شد. آب هم برای اسپرماتوزوآ و هم برای تخمک مضر می باشد (۱۸). پس با استفاده از فعال کننده ها مانند محلول نمکی نشان داده شده که محلول های فعال کننده باعث حفظ ساختار تاژک اسپرم شده و در نتیجه مدت زمان تحرک در مقایسه با آب بالاتر می رود (۱).

نتایج این تحقیق نیز تأیید کننده نتایج بدست آمده توسط محققان فوق در رابطه با اثر محلول های فعال کننده نمکی در مقایسه با آب معمولی می باشد زیرا مدت زمان تحرک اسپرم در فعال کننده های نمکی در مقایسه با آب بیشتر بوده و تفاوت معنی داری را با آن نشان می دهد. محققان در تحقیق های متفاوت، محیط با pH مساوی ۹ را جهت تحرک سلول های اسپرماتوزوئید، محیطی مناسب ارزیابی نموده اند. 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 فعال کننده های متفاوت اسپرم، این نکته بدست می آید که فعال کننده های متفاوت در تمامی گروه های مولدین نر، تاثیر تقریباً یکسانی را بر میزان لقاح تخمک ها در اواسط فصل تکثیر داشته اند و اختلاف معنی داری را در میزان لقاح در مقایسه با گروه شاهد خود، نشان ندادند این در حالی است که در تحقیقی روی اسپرم ماهی قزل آلائی 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 آلائی 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

وحشی برخوردارند نیز این فعال کننده ها بر افزایش میزان چشم زدگی و تخم گشایی در اواسط فصل تکثیر تأثیری نداشته است استفاده از محلول های فعال کننده اسپرم مورد تحقیق، تأثیرات معنی دار 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. ب. ابطحی، ب. و نظری، ر. م. ۱۳۸۱. استفاده از تقویت کننده های اسپرم در لقاح تخمک تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus*، دومین همایش ملی منطقه ای ماهیان خاویاری، صفحات: ۱۱۱-۱۱۵.
- ۲- پیکان خیرتی، ف. ۱۳۸۰. القاء تکثیر در جنس نر ماهی قزل آلاهی رنگین کمان با استفاده از هورمون سنتتیک GnRH، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات دانشگاه تهران، دانشکده منابع طبیعی کرج، ۷۷ص.
- ۳- حسینی، س، ش. ۱۳۸۸. تاثیر محلول های فعال کننده اسپرم بر بهبود کارایی تولیدمثل ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در اواخر فصل تکثیر، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات دانشگاه آزاد لاهیجان، ۱۰۸ص.
- ۴- رضوانی، م، ۱۳۸۹. بررسی اثر محلول های 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.

با بررسی نتایج حاصل از تخم گشایی، در اواسط فصل تکثیر، مشاهده می شود که همچنان در تمامی فعال کننده های نمکی، اختلاف معنی داری 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 فعال کننده ها ایجاد کرده اند حاصل شده باشد که نتیجه آن در میزان بالاتر لقاح، چشم زدگی و تخم گشایی تمامی گروه های مورد مطالعه به چشم می خورد. با توجه به اینکه اسپرماتوزوآ تنها در یک نقطه یعنی میکروپیل می تواند در تخمک نفوذ کند (۱۶). بنابراین طبیعی به نظر می رسد که با افزایش تحرک اسپرم، میزان لقاح و در مرحله بعد چشم زدگی بالاتر باشد که نتیجه این ارتباط، همبستگی معنی دار آنها می باشد.

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 پلاسماهی منی ماهی کفشک اقیانوس اطلس *Hippoglossus hippoglossus* را در طول فصل تکثیر بررسی کردند (۱۳). و نتیجه گرفتند که افزایش غلظت اسپرم، با پارامترهای کیفی اسپرم از قبیل تحرک اسپرماتوزوآ، درصد سلول های متحرک، حرکت موجی شکل و مستقیم اسپرماتوزوآ دارای رابطه معنی داری بوده، و با افزایش غلظت اسپرم، پارامترهای یاد شده کاهش یافته اند. نتایج تحقیق حاضر نیز در ارتباط با افزایش دوره تحرک اسپرماتوزوآ با کاهش غلظت اسپرم در اواسط فصل تکثیر، نتایج محققان یاد شده را تأیید می نماید. بررسی تاثیر محلول های فعال کننده اسپرم بر بهبود کارایی تولید مثل ماهی آزاد وحشی دریای خزر انجام شد (۴). نتایج این تحقیق نشان داد که فعال کننده ها در میزان چشم زدگی و تخم گشایی تأثیری نداشته است. در مورد ماهی آزاد پرورشی دریای خزر که از کیفیت لقاح پایین تری نسبت به

- parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.) Theriogenology (2009) Article in press.
- 13-Babiak, I., Ottesen, R., Rudolfson, O., and Johnsen, S. 2006. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., sperm throughout 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., Perche, 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. 232: 129-139.
- 21-Cosson, J., Billard, R., Gibert, C., Dreanno, C. and Suquet, M. 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In the
- 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 ارشد شیلات، دانشگاه تهران، ۱۰۵ ص.
- 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، ص ۱۳۲-۱۴۲.
- ۸-لرستانی، ر. ۱۳۸۳. اثر سن مولد نر و محلول‌های تقویت‌کننده بر مدت زمان تحرک اسپرم و میزان باروری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، ص ۶۷.
- 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 ارشد شیلات، 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 sperm morphology, motility and flagellar wave

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.

Archive of SID