مقایسه خصوصیات و قابلیت لقاح اسپرم در ماهیان نر تغییر جنسیت یافته و مولدان معمولي قزل‌آلاي رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

سيد علي جوهري[1], محمد رضا كلباسي[2]*, امير سعيد ويلكي[3], مريم طلا[4]

١- دانش آموخته كارشناسي ارشد شيلات, دانشكده منابع طبيعي و علوم دريايي, دانشگاه تربيت مدرس، نور، ايران
٢- استاديار گروه شيلات, دانشكده منابع طبيعي و علوم دريايي, دانشگاه تربيت مدرس، نور، ايران
٣- كارشناس ارشد، بخش تكثير و پرورش آبزيان (پرورش ماهيان سردآبی), سازمان شيلات ايران، تهران، ايران
٤- كارشناس ارشد, بخش تكثير و پرورش آبزيان (پرورش ماهيان سردآبی)، سازمان شيلات ايران، تهران، ايران

چکیده

با توجه به اهمیت ماهیان تغییر جنسیت یافته در تولید جمعیت تمام ماده قزل‌آلای رنگین کمان، در این مطالعه خصوصیات اسپرم ماهیان نر تغییر جنسیت یافته (تیمار۱) با اسپرم ماهیان نر معمولی- که به دو روش فشار ناحیه شکمی (شاهد) و جراحی و برداشت مستقیم از بافت بیضه (تیمار۲) استخراج گردید- از نظر درصد اسپرماتوکریت، مدت زمان تحرک در آب و محلول تقویت کننده اسپرم، درصد اسپرماتوزوآی متحرک، قابلیت لقاح و تولید بچه ماهیان سالم بررسی شد. براساس نتایج بررسی، ماهیان مورد مطالعه بجز درصد اسپرماتوکریت و درصد اسپرماتوزوآی متحرک، در موارد دیگر تفاوت معناداری نداشتند. میزان اسپرماتوکریت اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته (٨٤٪) با اسپرم نرهای معمولی تیمار۲ (٧٨٪) تفاوتی نداشت. اما هردو از اسپرماتوکریت نرهای معمولی گروه شاهد (٣٥/٣٣٪) بالاتر بودند. در اسپرم نر معمولی (خارج شده با فشار ناحیه شکمی تعداد اسپرماتوزوآهای متحرک بیشتر از اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته و در اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته نیز، این میزان از اسپرم نرهای معمولی (خارج شده با جراحی) بالاتر بود (P< ٠/٠١). همچنین شاخص گنادوسوماتیک نرهای معمولی و تغییر جنسیت یافته مورد مقایسه قرار گرفت و مشخص شد این شاخص در نرهای تغییر جنسیت یافته بالاتر است (P< ٠/٠٥). نتایج استفاده از یک نوع محلول تقویت کننده بیانگر آن است که محلول تقویت کننده به طور معناداری موجب افزایش مدت زمان تحرک اسپرم در ماهیان تغییر جنسیت یافته شد (P<٠/٠٥).

کلیدواژگان: قزل‌آلای رنگین کمان، نر تغییر جنسیت یافته، اسپرم، محلول تقویت کننده اسپرم.

١- مقدمه

یکی از مزایای کنترل جنسیت ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در صنعت آبزی پروری امکان تولید جمعیت تمام ماده است. قزل‌آلاهای ماده دیرتر از قزل‌آلاهای نر به رسیدگی جنسی رسیده و در نتیجه قبل از بلوغ به اندازه بازاری می‌رسند؛ اما قزل‌آلاهای نر در سنین پایین (از ٦ ماه تا یک سال) به بلوغ می‌رسند و انرژی مصرفی را به جای افزایش رشد صرف فعالیتهای تولیدمثلی می‌کنند[١، ٢].

* نویسندهٔ مسؤول مقاله: تلفن: ٣-٠١٢٢٦٢٥٣١، E-mail: kalbassi_m@modares.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

اولین قدم برای تولید جمعیت تمام ماده، تولید نرهای تغییر جنسیت یافته یا ماده‌های نر سازی شده[1] است؛ یکی از روشهای آن استفاده از هورمونهای استروییدی است که به طور معمول تخم یا لاروها را در محلولهای استروییدی غوطه ور می‌کنند یا به جانور جیره غذایی حاوی این هورمون می‌خورانند[۳]. این کار باعث رشد بیضه فعال در جانور ماده از نظر ژنتیکی می‌شود؛ بیضه اسپرمی تولید می‌کند که به جای کروموزومهای X,Y، فقط حامل کروموزوم X است. نرهای تغییر جنسیت یافته فاقد مجرای اسپرم بَرند و برای استحصال اسپرم باید مورد عمل جراحی قرار گیرند [۱]. شایان ذکر است، اسپرمی که به طور مستقیم از بیضه استحصال می‌شود، تحولاتی مانند باز جذب اسپرماتوزوآ، تنظیم ترکیبات یونی مایع سلومیک و تراوشهای هورمونی را که در نرهای معمولی داخل مجرای اسپرم بَر طی می‌شود، نمی‌گذارنند.

با توجه به اهمیت نرهای تغییر جنسیت یافته در روند تولید جمعیتهای تمام ماده در صنعت آبزی پروری، شناخت ویژگیهای مواد تناسلی این ماهیان می‌تواند در یافتن راههای بهبود عملیات تکثیر این ماهیان کمک زیادی کند.

هدف از این مطالعه بررسی برخی از خصوصیات اسپرم ماهیان نر تغییر جنسیت یافته قزل آلای رنگین کمان در مقایسه با نرهای معمولی بود. همچنین تأثیر چگونگی اسپرم‌گیری به روش جراحی و فشار ناحیه شکمی بر کیفیت اسپرم، قابلیت لقاح اسپرم این ماهیان و تأثیر استفاده از مواد تقویت کننده در افزایش مدت زمان تحرک اسپرم این ماهیان مقایسه شد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- مولدان

این آزمایش در اردیبهشت سال ۱۳۸۳ در کارگاه تکثیر و پرورش آزادماهیان شهید باهنر واقع در رودبارک کلاردشت انجام شد. در این آزمایش از مخلوط تخمک ۳ مولد ماده (۲-٤ ساله)، ٦ مولد نر معمولی (برای استحصال اسپرم حاوی کروموزومهای X و Y) و ۳ مولد نرسازی شده برای استحصال اسپرم با کروموزوم X) استفاده گردید. مولدان نر مورد استفاده همگی سه ساله بودند.

نرهای تغییر جنسیت یافته بر اساس خصوصیات ظاهری (انحنای فکین و تیرگی رنگ بدن) از میان ماهیانی که در سنین اولیه تیمار هورمونی (آندروژن) روی آنها انجام گرفته بود، انتخاب شدند [۴]. از آنجا که براساس یافته‌های محققان اصولاً در تمام مولدان نر تغییر جنسیت یافته، مجرای اسپرم بَر[2] تشکیل نمی‌شود[۵]، بنابراین در بررسی حاضر نیز از این معیار برای اطمینان از تغییر جنسیت یافته بودن آنها استفاده شد.

نرهای معمولی به طور تصادفی از میان جمعیت مولدان نر رسیده موجود در کارگاه انتخاب شدند و برای اطمینان از رسیدگی جنسی با فشار کمی بر ناحیه شکمی کیفیت اسپرم خارج شده از نظر ظاهری ارزیابی گردید. ماده‌های معمولی نیز به صورت تصادفی از میان جمعیت مولدان ماده موجود در کارگاه انتخاب و برای اطمینان از رسیدگی تخمکهایشان، با فشار کمی بر ناحیه شکمی تخمک رسیده سالم خارج شده از مخرج آنها ارزیابی شد.

۲-۲- استحصال مواد تناسلي

استحصال تخمک از ماده‌های معمولی و اسپرم از نرهای معمولی، پس از بیهوش کردن مولدان در آب حاوی $MS_{۲۲۲}$، به شیوه متداول درکارگاههای تکثیر انجام شد. به منظور کاهش آثار استفاده از مولدان ماده مختلف در نتایج آزمایش، تخمکهای استحصالی قبل از لقاح بخوبی با هم مخلوط شدند و برای هر تیمار (۵۰۰ تخمک) از مخلوط تخمکها استفاده گردید[۶].

1. Neomale

2. Sperm duct

Archive of SID
www.SID.ir

برای برداشت اسپرم از ماهیان نر تغییر جنسیت یافته –که فاقد مجرای اسپرم بَر بودند– پس از بیهوش کردن مولدان، با ایجاد شکافی از ناحیه مخرج تا زیر باله شکمی به وسیله اسکالپل محوطه شکمی باز و سپس بیضه‌ها به آرامی خارج گردید، سپس برای جلوگیری از مخلوط شدن خون با اسپرم، مویرگهای خونی موجود در اطراف بافت بیضه به وسیله پنس جدا شد و سطح بیضه با پارچه‌ای تمیز خشک گردید. برای جداسازی اسپرم از بافت بیضه، با استفاده از یک الک با چشمه ۲mm بیضه‌ها فشار داده شد و اسپرم رها شده از بیضه در ظرفی زیر الک جمع گردید. ظرف مذکور روی قطعات یخ خرد شده قرار گرفت تا با پایین نگه داشتن دما از هرگونه تغییر در ماهیت اسپرم استحصالی جلوگیری شود(شکل۱).

از آنجا که اسپرم ماهیهای نر سازی شده به طور مستقیم از بیضه خارج شده بود، اسپرم تعدادی از نرهای معمولی نیز به طور مستقیم از بیضه استحصال شد. این عمل به منظور مقایسه آنها با اسپرم نرهای معمولی که با فشار شکم از مجرای اسپرم بَر[1] خارج شده بودند، انجام شد. تمام مواد تناسلی استحصالی پیش از لقاح در یخچال قرار گرفت. در تمام موارد وزن و طول کل مولدان نر اندازه‌گیری و ثبت شد. همچنین برای محاسبه شاخص گنادوسوماتیک[2] (GSI)، در مواردی که مولدان نر کشته می‌شدند، وزن بیضه‌ها به وسیله ترازوی دیجیتال ثبت گردید.

۲-۲-۱- محاسبه مدت زمان تحرک اسپرمها

برای محاسبه مدت زمان تحرک اسپرم هر مولد نر، یک قطره کوچک اسپرم روی یک لام خشک و تمیز چکانده شد و یک لامل روی آن قرارداده شد. سپس نمونه در زیر میکروسکوپ نوری قرار گرفت و پس از تنظیم میکروسکوپ مدت زمان تحرک اسپرمها یک بار با چکاندن یک قطره آب معمولی و بار دیگر با چکاندن یک قطره محلول تقویت کننده اسپرم {Glycin ۱/۰۵۰۲g +Tris ۱/۲۱۱g+NaCl ۹g و pH=۹}[۷]، سنجش شد. شایان ذکر اینکه مدت زمان تحرک اسپرم تا زمان متوقف شدن ۹۵ –۹۹٪ سلولها در نظر گرفته شد[۸].

شکل۱ چگونگی جداسازی اسپرم از بیضه ماهیان تغییر جنسیت یافته

1. Sperm duct

2. Gonado somatic index

Archive of SID
www.SID.ir

۲-۲-۲- محاسبه درصد تحرك اسپرمها

برای محاسبه درصد تحرک اسپرم هر مولد نر، یک قطره کوچک اسپرم روی یک لام خشک و تمیز چکانده و یک لامل روی آن قرار داده شد. سپس نمونه در زیر میکروسکوپ نوری قرار گرفت و پس از تنظیم میکروسکوپ به آرامی یک قطره محلول تقویت کننده اسپرم بیلارد [۷] در کنار لامل چکانده شد تا به زیر آن نفوذ کند و اسپرمها را به تحرک وا دارد. درصد اسپرمهای متحرک در هر نمونه به طور تقریبی با چشم سنجش شد و بسته به تعداد اسپرمهای متحرک اعداد حاصل در سیستم ۵-۰ طبقه‌بندی گردید[۹]. در این سیستم فقط اسپرمهای با حرکت رو به جلو، متحرک و اسپرمهای با حرکت به دور خود یا حرکت پاندولی، غیر متحرک محسوب می‌شوند (جدول۱).

۲-۲-۳- محاسبه درصد اسپرماتوکریت

برای محاسبه درصد اسپرماتوکریت از لوله‌های میکروهماتوکریت استفاده شد. اسپرم بر اساس خاصیت مووینگی از این لوله بالا می‌رود، مگر در مواردی که غلظت آن خیلی بالا باشد، در این حال اسپرم با اندکی مکش به داخل لوله هدایت می‌شود. انتهای لوله‌های میکروهماتوکریت حاوی اسپرم، به وسیله خمیر مخصوص مسدود شد تا اسپرم از آن تخلیه نشود. پس از آن به منظور جداسازی اسپرم از فاز مایع، لوله‌های میکروهماتوکریت به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰g در دستگاه میکروسانتریفوژ افقی، سانتریفوژ گردید؛ سپس درصد اسپرماتوکریت به وسیله خط کش مخصوص خوانده شد [۱۰].

۲-۲-٤- محاسبه شاخص گنادوسوماتیك GSI

شاخص گنادوسوماتیکGSI از رابطه ۱ محاسبه گردید[۹].

رابطه۱ ۱۰۰× (وزن بدن/ وزن گناد)= شاخص گنادوسوماتیک

۲-۳- عملیات لقاح و انکوباسیون

تمام لقاحها به روش نیمه خشک انجام شد [۱۱]. برای به حداکثر رساندن میزان لقاح اسپرمها، در تمام تیمارها از محلول تقویت کننده بیلارد استفاده گردید. پس از عملیات لقاح، تخمها با آب کارگاه شسته و پوسته‌های تخم و اسپرمهای اضافی خارج شد. تخمهای لقاح یافته برای طی مراحل جنینی به سینیهای انکوباسیون منتقل گردیدند. تلفات انکوباسیون و تخمهای قارچ زده به طور روزانه شمارش و جدا گردید. پس از گذشت ۱۵۰ درجه روز تخمها شروع به چشم زدن کردند. با توجه به یکسان بودن شرایط محیطی، درصد چشم زدگی تخمها به عنوان معیاری برای سنجش میزان موفقیت لقاح و قابلیت لقاح اسپرم مولدان مدنظر قرار گرفت این مقدار از رابطه ۲ محاسبه شد:

رابطه ۲ ۱۰۰× (تعداد کل تخمها/ تعداد تخمهای چشم‌زده)
= درصد چشم زدگی

همچنین درصد تفریخ تخمهای چشم زده از رابطه ۳ محاسبه گردید:

رابطه ۳ ۱۰۰× (تعداد کل تخمهای چشم زده/ تعداد تخمهای تفریخ شده)
= درصد تفریخ تخمهای چشم زده

جدول۱ درصد اسپرمهای متحرک در تقسیم‌بندی ۵ دسته‌ای سنجش تحرک[۹]

دسته	۰	۱	۲	۳	٤	۵
درصد سلولهاي اسپرم متحرك	تمام اسپرمها بی‌تحرک	کمتر از ۱۰	۲۹-۱۰	۷٤-۳۰	۹٤-۷۵	بیشتر از۹۵

Archive of SID
www.SID.ir

۲-٤- تجزيه و تحليل آماري

تجزيه و تحليل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار spss۱۲ انجام شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف اسميرنف سنجيده شد. برای تعيين معنادار بودن اختلاف ميان عوامل مورد بررسی در سه تيمار، از تجزيه واريانس يک طرفه (ANOVA) استفاده شد. در صورت مشاهده اختلاف ميان داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تعيين معنادار بودن يا نبودن اختلاف موجود در سطح ۹۵٪ استفاده گرديد. آزمون T جفتی برای مقايسه معنادار بودن اثر استفاده از محلول تقويت کننده بر مدت زمان تحرک اسپرم در تيمارهای مختلف استفاده شد. مقايسه GSI ها در دو تيمار نر معمولی و نر تغيير جنسيت يافته، با استفاده از آزمون T غير جفتی صورت گرفت. بررسی اثر استفاده از محلول تقويت کننده اسپرم در هر يک از تيمارهای مورد مطالعه با استفاده از تجزيه واريانس دو طرفه انجام شد.

۳- نتايج

نتايج آزمون کولموگراف اسميرنف نشان داد که داده‌ها با اطمينان ۹۵٪ نرمال بودند (P>۰/۰۵). ميانگين داده‌های حاصل از بررسی انجام شده در جدول ۲ خلاصه شده است.

جدول۲ ميانگين و انحراف معيار مقادير عوامل مورد بررسی در تيمارهای مورد مطالعه

تيمار		GSI	ميزان اسپرماتوکريت (درصد)	مدت زمان تحرک اسپرم با آب (ثانيه)	مدت زمان تحرک اسپرم باتقويت کننده (ثانيه)	ميزان اسپرم‌هاي متحرک (سيستم**Liley**)	ميزان چشم‌زدگي (درصد)	ميزان تفريخ (درصد)
نر معمولي (اسپرم گيري با فشار شکم)	ميانگين	–	۳۵/۳۳	۲۳	۲۹/۳۳	۵	٦۰/۲٤	۹۸/۲۲
	SD	–	۲۱/۳	٤/۳۵	۵/۱۳	۰	۱٦/۰۱	۰/۸۳
نر معمولي (اسپرم گيري با جراحي)	ميانگين	۱/۱۲	۷۸	۲۱	۲۵/٦٦	۳	۳۰/۱۸	۹۷/۹۸
	SD	۰/۱۰	۷	۱	۱/۱۵	۰	٦/۱٤	۰/۸٤
نر تغيير جنسيت يافته (اسپرم گيري با جراحي)	ميانگين	۳/۰٦	۸٤	۲۸/۳۳	۳۸	۳/٦٦	۷۱/۱٤	۹۸/٤۹
	SD	۰/۹۳	۱۲/۱۲	۳/۷۸	۷/۵٤	۰/۵۷	۱/۱۷	۳۷/۱۳

جدول۳ نتايج تجزيه وايانس يک طرفه در تيمارهای مورد بررسی

عامل مورد سنجش	F محاسباتي
درصد اسپرماتوکريت	۳۰/۷۱٤**
مدت زمان تحرک اسپرم با آب	۳/۷٦۷ns
مدت زمان تحرک اسپرم با محلول تقويت کننده اسپرم	٤/۲٦٤ns
درصد تحرک اسپرم	۲۸/۰۰۰**
درصد چشم زدگی	۲/٤۲۰ns
درصد تفريخ	۰/۲۱۰ns

ns: بدون اثر معنادار(P> ۰/۰۵)

** واجد اختلاف معنادار

Archive of SID
www.SID.ir

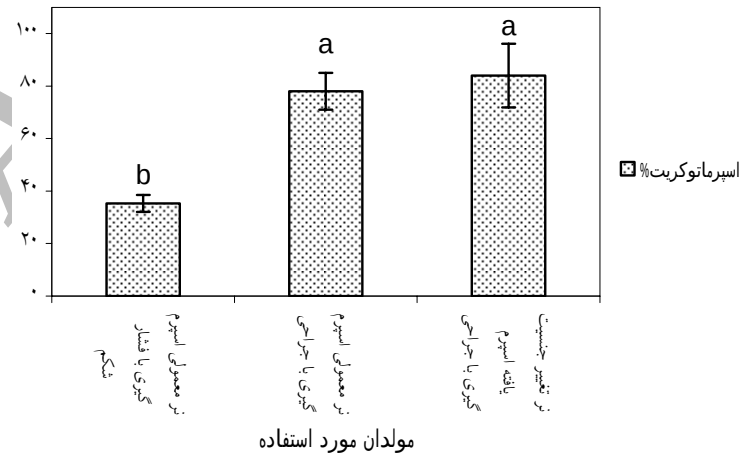
نتایج تجزیه واریانس یک طرفه در تیمارهای مورد بررسی به شرح جدول ۳ می‌باشد.

نتایج آزمون T غیر جفتی نشان دهنده وجود اختلاف معناداری (P<۰/۰۵) بین شاخص گنادوسوماتیک ماهیان نر تغییر جنسیت یافته و نرهای معمولی بود و میزان GSI در نرهای تغییر جنسیت یافته بالاتر بود. آزمون همبستگی پیرسون، همبستگی منفی، قوی و معناداری (P<۰/۰۱، r=-۰/۸۹۱) بین میزان اسپرماتوکریت و تعداد اسپرماتوزوآهای متحرک نشان داد؛ یعنی با افزایش میزان اسپرماتوکریت، تعداد اسپرماتوزوآهای متحرک کاهش یافت.

همبستگی مثبت، قوی و معناداری (P<۰/۰۱، r=۰/۸۵۲) بین مدت زمان تحرک اسپرم با آب و درصد چشم‌زدگی تخمها مشاهده شد. همچنین همبستگی مثبت، قوی و معناداری (P<۰/۰۱،r=۰/۸۷۷) بین مدت زمان تحرک اسپرم با آب و درصد چشم زدگی تخمها و همبستگی مثبت و معناداری (P<۰/۰۵، r=۰/۷٦٦) بین درصد چشم زدگی و درصد تفریخ تخمها مشاهده شد. براساس آزمون آنالیز واریانس یک طرفه، میزان اسپرماتوکریت اسپرم نرهای معمولی (خارج شده با فشار ناحیه شکمی)، در مقایسه با اسپرم نرهای معمولی (خارج شده با جراحی)، به طور معنادرای پایینتر بود(P<۰/۰۱). میزان اسپرماتوکریت اسپرم نرهای معمولی نیز که با فشار ناحیه شکمی خارج شده بود در مقایسه با اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته به طور معناداری پایینتر بود (P<۰/۰۱). در حالی که اختلاف معناداری بین اسپرماتوکریت نرهای تغییر جنسیت یافته با اسپرم نرهای معمولی که با جراحی خارج شده بود، مشاهده نگردید(P>۰/۰۵).

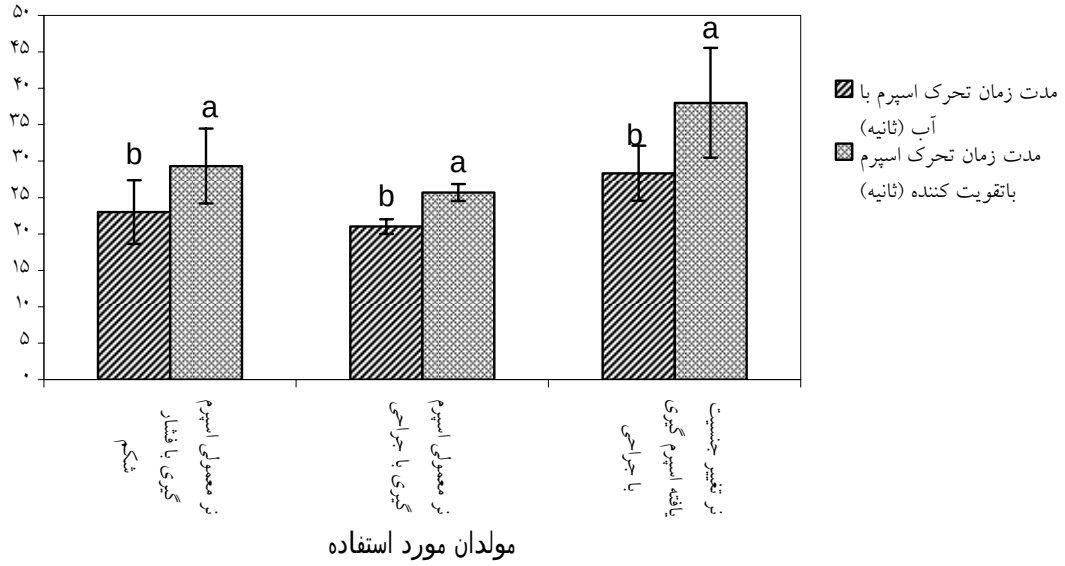
براساس آزمون آنالیز واریانس یک طرفه، مدت زمان تحرک اسپرم فعال شده با آب میان هیچکدام از سه تیمار مورد بررسی تفاوت معناداری نشان نداد (P>۰/۰۵). همچنین مدت زمان تحرک اسپرم فعال شده با محلول تقویت کننده بیلارد میان هیچکدام از تیمارها اختلاف معناداری نداشت(P>۰/۰۵). آزمون T جفتی نشان داد که محلول تقویت کننده اسپرم در هر سه تیمار مورد بررسی به طور معناداری باعث افزایش مدت زمان تحرک اسپرم می‌گردد(P<۰/۰۵). آزمون آنالیز واریانس دو طرفه نیز نشان داد که محلول تقویت کننده اسپرم در سه تیمار مورد بررسی به یک اندازه باعث افزایش مدت زمان تحرک اسپرم می‌شود (P>۰/۰۵).

آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد درصد تحرک اسپرم یا تعداد اسپرماتوزوآهای متحرک در سه تیمار مورد بررسی اختلاف معنادار داشتند(P<۰/۰۱)؛ بدین ترتیب که در اسپرم نر معمولی- با فشار ناحیه شکمی خارج شد- تعداد اسپرماتوزوآهای متحرک بیشتر از اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته بود و در اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته نیز، این میزان از اسپرم نرهای معمولی- با جراحی خارج گردید- بالاتر بود(نمودار۳).

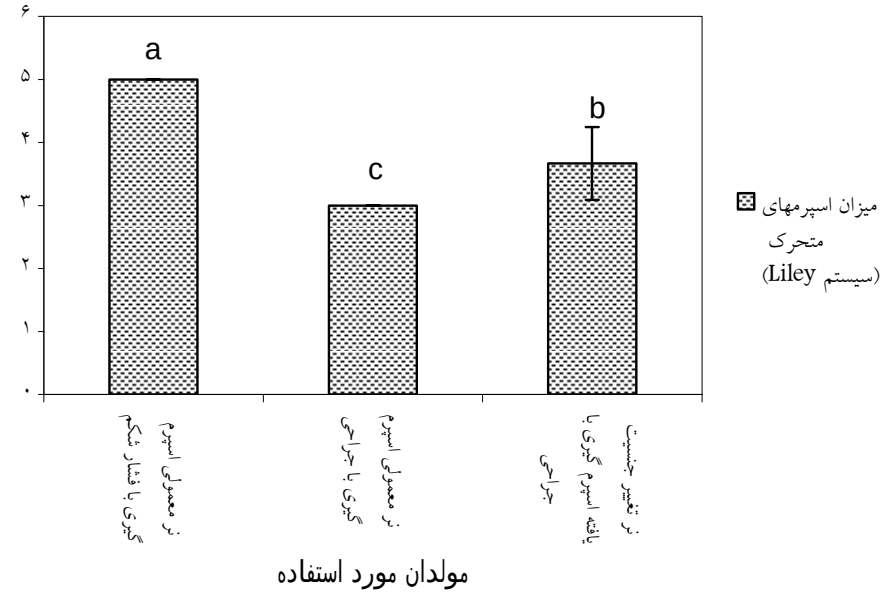


نمودار۱ مقایسه درصد اسپرماتوکریت در تیمارهای مورد بررسی

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار۲ اثر محلول تقویت کننده بر مدت زمان تحرک اسپرم در تیمارهای مورد بررسی



نمودار۳ مقایسه درصد اسپرماتوزوآهای متحرک در تیمارهای مورد بررسی [۹]

www.SID.ir

در هیچ یک از سه تیمار مورد بررسی، درصد چشم زدگی و تفریخ تخمها، اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند($P>0/05$).

٤- بحث و نتیجه گیري

براساس مطالعات، درصد چشم زدگی تخمها می‌تواند به عنوان معیاری برای سنجش درصد لقاح، قابلیت لقاحی اسپرم و تخمک استفاده شود [۱۲]؛ از آنجا که در مطالعه حاضر از مخلوط تخمک چندین مولد ماده استفاده شد، بنابراین درصد چشم زدگی تخمها می‌تواند نشان دهنده قابلیت لقاحی اسپرم باشد. هیچکدام از خصوصیات اسپرم که در این مطالعه اندازه‌گیری شدند، تفاوت معناداری در قابلیت لقاحی بین مولدان نرهای معمولی و نرهای تغییر جنسیت یافته نشان نمی‌دهند. بیشتر تفاوتهایی که در مورد خصوصیات اسپرم نرهای معمولی و نرهای تغییر جنسیت یافته مشاهده شد، می‌تواند به تفاوت بین اسپرم استحصال شده از بیضه و اسپرم موجود در مایع منی که با فشار ناحیه شکمی خارج گردید، نسبت داده شود.

در فصل تولیدمثل، اسپرماتوزوآی نرهای معمولی در مجرای اسپرم بَر نگهداری می‌شود؛ در حالی که در نرهای تغییر جنسیت یافته به علت نبود این مجرا، اسپرماتوزوآ در داخل بیضه باقی می‌ماند. بنابراین در این مطالعه مشاهده می‌شود میزان اسپرماتوکریت اسپرم نرهای معمولی که با فشار ناحیه شکمی خارج شده بود، در مقایسه با اسپرم نرهای معمولی و نیز اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته که با جراحی خارج شده بودند، به طور معناداری پایینتر بود؛ در حالی که اختلاف معناداری بین اسپرماتوکریت نرهای تغییر جنسیت یافته با اسپرم نرهای معمولی که با جراحی خارج گردیدند، مشاهده نشد.

اسپرماتوکریت معیار آسان و سریعی برای تخمین غلظت اسپرم در مایع منی می‌باشد و با آن رابطه مستقیم دارد[۹]. نتایج یک تحقیق نشان داد که تراکم اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته به طور معناداری از تراکم اسپرم نرهای معمولی که با فشار ناحیه شکمی خارج شد، بالاتر بود. همچنین، تفاوت معناداری بین تراکم اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته و نرهای معمولی جراحی شده وجود نداشت[۱۳].

در واقع اسپرماتوکریت نشان دهنده نسبت حجم اسپرم به حجم منی می‌باشد. بالا بودن میزان اسپرماتوکریت در اسپرمی که به طور مستقیم از بیضه برداشت می‌شود، در مقایسه با اسپرمی که با فشار ناحیه شکمی خارج می‌شود می‌تواند بدین دلیل باشد که در حالت برداشت مستقیم از بیضه، اسپرم فاقد مایع منی است یا مقدار تراوشات آن بسیار کم است؛ در صورتی که اسپرمی که با فشار ناحیه شکمی خارج می‌شود با تراوشات مایع منی مخلوط است، بنابراین تراکم کمتری نیز دارد.

درصد اسپرماتوزوآهای متحرک در اسپرم نرهای معمولی که با فشار ناحیه شکمی خارج شد، بیشتر از اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته بود. اسپرم نرهای معمولی که از مجرای اسپرم بَر خارج می‌شود با تراوشات مایع منی مخلوط است که حاوی مواد آلی و معدنی مورد نیاز برای زندگی اسپرماتوزوآ می‌باشد بنابراین اسپرماتوزوآ در این مایع بقای طولانیتری دارد و نسبت اسپرماتوزوآهای متحرک در این ماهیان بیشتر است؛ زیرا اسپرماتوزوآهای مرده از طریق مجرای اسپرم بَر بسرعت باز جذب می‌شوند[۱۴]. در حالی که اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته حاوی اسپرماتوزوآهای زنده همراه با اسپرماتوزوآهای مرده تجمع یافته در داخل بیضه است که بتدریج بازجذب می‌شوند. علت دیگر می‌تواند این باشد که در نرهای تغییر جنسیت یافته اسپرم داخل بیضه با اسپرمهایی مخلوط است که هنوز به بلوغ ساختاری خود نرسیده‌اند[۱۳].

درصد اسپرماتوزوآهای متحرک در اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته از اسپرم نرهای معمولی که با جراحی خارج گردید، بالاتر بود. در نرهای معمولی اسپرماتوزوآ پس از تکامل و رسیدن به بلوغ وارد مجرای اسپرم بَر می‌شود و در

Archive of SID
www.SID.ir

داخل بیضه مراحل جدید اسپرماتوژنز شروع می‌شود. اسپرمی که مستقیم از بیضه نرهای معمولی خارج می‌شود هنوز تکامل نیافته است، بنابراین درصد تحرک پایینی دارد. اما در نرهای تغییر جنسیت یافته اسپرماتوزوآی بالغ در داخل بیضه باقی می‌ماند. درصد تحرک اسپرم نرهای معمولی که با فشار شکم خارج شد، همیشه ۱۰۰٪ بود. زیرا اسپرم بالغ به داخل مجرای اسپرم بَر هدایت و تمام مراحل تکامل آن در این مجرا طی می‌شود.

جفن[1] و اوانس[2] در سال ۲۰۰۰ دریافتند که مدت زمان تحرک اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته به طور معناداری طولانیتر از اسپرم نرهای معمولی بود که با جراحی خارج گردیدند. در مطالعه حاضر مدت زمان تحرک اسپرم فعال شده با آب یا محلول تقویت کننده اسپرم بین هیچ یک از سه تیمار مورد بررسی تفاوت معناداری نشان نداد. اگرچه مدت زمان تحرک اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته از مدت زمان تحرک اسپرم نرهای معمولی که با فشار شکم خارج شده بود به طور متوسط ۹ ثانیه بیشتر بود اما این افزایش معنادار نبود.

استفاده از محلول تقویت کننده اسپرم در هر سه تیمار مورد بررسی به طور معناداری باعث افزایش مدت زمان تحرک اسپرم گردید. بیلارد[3] و همکاران در سال ۱۹۷٤ دریافتند محلولهای تقویت کننده اسپرم به علت دارا بودن ترکیبات یونی مورد نیاز اسپرم، ایجاد فشار اسمزی و pH مناسب، باعث افزایش مدت زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای معمولی می‌شوند [۷]. مطالعه حاضر نشان می‌دهد محلولهای تقویت کننده اسپرم اثر مشابهی بر مدت زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای نر تغییر جنسیت یافته دارند؛ بنابراین می‌توان از این محلولها برای افزایش موفقیت لقاح در ماهیان نر تغییر جنسیت یافته استفاده کرد. این بررسی نشان داد محلولهای تقویت کننده اسپرم در هر سه تیمار مورد بررسی به یک میزان باعث افزایش مدت زمان تحرک اسپرم می‌شود.

در این مطالعه درصد چشم زدگی تخمها که به عنوان معیاری برای سنجش درصد لقاح استفاده شد، بین سه تیمار مورد بررسی اختلاف معناداری نداشت. جفن و اوانس در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که درصد لقاح اسپرم کشیده شده از نر معمولی نسبت به اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته به طور معناداری بالاتر بود [۱۳]. همچنین اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته نسبت به اسپرم نرهای معمولی که با جراحی خارج شده بود، موجب درصد لقاح بالاتری گردید. شاید علت آن، این باشد که در مطالعه حاضر نسبت اسپرم به تخمک برای انجام لقاح بالا بود. موسیا[4] و مانکیتریک[5] در سال ۱۹۸٦ نشان دادند در صورت بالاتر بودن نسبت اسپرم به تخمک از حد اپتیمم، حرکت اسپرم، غلظت اسپرم یا اسپرماتوکریت هیچ کدام عامل اصلی برای مشخص کردن رسیدن تخمها به مرحله چشم‌زدگی نمی باشند[۶]. بنابراین در تولید جمعیتهای تمام ماده با استفاده از اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته، اگر از مقدار اسپرم کافی برای لقاح استفاده کنیم، درصد لقاح بالایی را شاهد خواهیم بود.

درصد تفریخ تخمها میان سه تیمار مورد بررسی اختلاف معناداری نداشت. این امر نشان می‌دهد که تخمهای لقاح یافته با اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته از نظر طی مراحل تکامل جنینی مشابه تخمهای لقاح یافته با اسپرم نرهای معمولی است و هیچ تفاوتی ندارند. بنابراین در تولید جمعیتهای تمام ماده با استفاده از اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته، شاهد کاهش درصد تفریخ تخمها نخواهیم بود. در واقع کیفیت اسپرم این ماهیان از نظر تولید جنینهای سالم و با کیفیت مشابه ماهیان نر معمولی است.

جفن و اوانس در سال ۲۰۰۰ دریافتند که میزان GSI در نرهای معمولی بیشتر از نرهای تغییر جنسیت یافته بود[۱۳]. اگرچه تمام ماهیان بررسی شده هم سن بودند اما اندازه نرهای معمولی کوچکتر از نرهای تغییر جنسیت یافته بود.

1. Geffen
2. Evans
3. Billard
4. Moccia
5. Munkittrick

Archive of SID
www.SID.ir

در مطالعه حاضر نشان داده شد که میزان GSI در نرهای تغییر جنسیت یافته بیشتر از نرهای معمولی است؛ البته در اینجا اندازه نرهای معمولی و تغییر جنسیت یافته یکسان بود و تفاوت معناداری نداشت($P>0/05$). بنابراین در کل به نظر می‌رسد اندازه بیضه در ماهیان تغییر جنسیت یافته بزرگتر از ماهیان معمولی باشد که از نظر اندازه با آنها یکسانند.

تود[1] و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که ارتباط خطی رگرسیونی معناداری بین غلظت اسپرم و اسپرماتوکریت وجود دارد؛ این رابطه اسپرماتوکریت را به عنوان یک عامل مناسب برای تخمین سریع غلظت اسپرم معرفی می‌کند. بررسی حاضر نشان می‌دهد که با افزایش میزان اسپرماتوکریت، تعداد اسپرماتوزوآهای متحرک کاهش می‌یابد. اسپرماتوکریت در واقع نسبت حجم اسپرم به حجم منی است[۱۳]. با افزایش اسپرماتوکریت، غلظت اسپرم افزایش و مقدار مایع منی و مواد مغذی لازم برای زنده ماندن اسپرم کاهش می‌یابد؛ بنابراین تعداد اسپرمهای متحرک کاهش می‌یابد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که با افزایش مدت زمان تحرک اسپرم، درصد چشم زدگی تخمها که معیاری برای تخمین درصد لقاح است، افزایش می‌یابد. در واقع با افزایش مدت زمان تحرک اسپرم، شانس رسیدن اسپرم به سوراخ میکروپیل افزایش می‌یابد و در نتیجه درصد لقاح و به دنبال آن درصد چشم زدگی افزایش می‌یابد. در این مطالعه رابطه معناداری بین میزان اسپرماتوکریت و مدت زمان تحرک اسپرم مشاهده نگردید؛ همچنین رابطه‌ای بین مدت زمان تحرک اسپرم و درصد اسپرماتوزوآی متحرک مشاهده نشد.

این نتایج با یافته‌های ودت و همکاران در سال ۲۰۰۱ در مورد ماهی کفشک هالیبوت (*Hipoglossus hipoglossus*) مشابه است. همچنین در این مطالعه هیچگونه رابطه‌ای بین تراکم اسپرم و قابلیت لقاح مشاهده نشد؛ این امر با نتایج آس[2] و همکاران در سال ۱۹۹۱ بر ماهی آزاد اقیانوس اطلس مشابه است.

نکته جالب توجه در مطالعه حاضر، این است که با وجود انجام عملیات تکثیر در اواخر دوره تکثیر (اواسط اردیبهشت)، کیفیت و کمیت اسپرم در تمام تیمارها در حد قابل قبول برای لقاح بود.

در جمع‌بندی نهایی می‌توان بیان کرد که اسپرم ماهیان تغییر جنسیت یافته دارای کیفیت بالایی است که با اسپرم استحصالی از ماهیان نر معمولی قابل مقایسه می‌باشد. بنابراین استفاده از این ماهیان برای تولید جمعیت تمام ماده توصیه می‌شود. همچنین استفاده از محلولهای تقویت کننده اسپرم برای افزایش کیفیت اسپرم استحصالی از ماهیان تغییر جنسیت یافته پیشنهاد می‌شود.

۵- سپاسگزاري

در پایان لازم است از تمام مسؤولان و کارکنان محترم کارگاه شهید باهنر کلاردشت بخصوص جناب آقای مهندس پاشا زانوسی ریاست محترم مرکز و آقای مهندس گلشاهی مدیر محترم بخش تکثیر که در تمام مراحل اجرای این بررسی با ما همکاری داشتند، نهایت قدردانی را داشته باشیم.

٦- منابع

[1] Bye V. J., Lincoln R. F.; "Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout"; *Aquaculture*. 1986; 57: 299-309.

[2] Panadian T. J., Sheela S. G.; "Hormonal induction of sex reversal in fish"; *Aquaculture.* 1995; 138: 1-22.

[3] Piferre F.; "Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish"; *Aquaculture*; 2001; 197: 229-281.

[٤] طلا م.؛ "بهینه سازی تیمار هورمون ۱۷ آلفا متیل تستوسترون به منظور ایجاد تغییر جنسیت و عقیمی در ماهی قزل آلا"؛ *پایان‌نامه کارشناسی ارشد*؛ دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران؛ ۱۳۸۰؛ ص. ۲۵۰.

1. Tvedt

2. Aas

Archive of SID
www.SID.ir

[5] Johnstone R.; "Experience with salmonid sex reversal and triploidisation technologies in the united kingdom"; *Bull; Aquacul. Assoc; Canada;* 1996; (2).

[6] Moccia R. D., Munkittrick, K. R.; "Relationship between the fertilization of rainbow trout *(Salmo gairdeneri)* eggs and the motility of spermatozoa"; *Theriogenology*; 1986; 27: 679-688.

[7] Billard R., Petit J., Jalabert B., Szoilosi D.; **"**Artifical insemination in trout using a sperm diluents. In J. H. S. Blaxter, editor. Early life history of fish. Springer - verlag, Berlin; 1974; pp. 715- 723.

[8] Billard R.; **"**Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the rainbow trout"; *J. Repro. Fert*. 1983; 68: 77-84.

[9] Liley N. R., Tamkee P., Tsai R., Hoysak D. J.; "Fertilization dynamics in rainbow trout: Effects of male age, social experience, and sperm concentration and motility on in vitro fertilization"; *Can. J. Fish. Aquat. Sci*. 2002; 59: 144-152.

[10] Vladi T. V., Afzelius B. A., Bronnikov G. E.; "Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories"; *Biology of Reproduction*. 2002; 66: 98-105.

[11] Arabac M., Dilerb I., Sarb M.; "Induction and synchronization of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified buserelin (GnRHa) and its effects on egg quality"; *Aquaculture*. 2004; 237: 475- 484.

[12] Aas G. H., Refstie T., Gjerde B.; **"**Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*"; 1991; 95: 125-132.

[13] Geffen A. J., Evans J. P.; **"**Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout"; *Aquaculture*; 2000; 182: 61-72.

[14] Robles V., Cabrita E., Cunado S., Herraez M. P.; **"**Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout: Parameters that affect its ability for freezing"; *Aquaculture*; 2003; 224: 203-212.

[15] Tvedt H. B., Benfey T. J., Martin-Robichaud D. J., Power J.; "The relationship between spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*"; *Aquaculture*; 2001; 194: 191-200.

Archive of SID

www.SID.ir