مقایسه ترکیبات مایع تخمدانی، مایع منی و خون مولدین ماهی سفیدک سیستان (*Schizothorax zarudnyi*) و بررسی اثر مایع تخمدانی بر تحرک اسپرم

عبدالعلی راهداری*[1]، احمد قرایی[1]، رضا فدایی[2]، مرتضی جهانتاب[2]، عباس علیزاده[3]

[1]گروه شیلات، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

[2]مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان بومی و گرمابی، زهک، ایران.

[3]معاونت آبزی‌پروری، اداره کل شیلات آب‌های داخلی، زابل، ایران.

*نویسنده مسئول: rahdari57@uoz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۸/۵/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۸/۸/۲۷

چکیده

در این مطالعه، علاوه بر سنجش ترکیبات آلی (گلوکز، کلسترول، پروتئین کل و آلبومین) و یونی (کلسیم، فسفر، منیزیوم، سدیم و پتاسیم) مایع تخمدانی و سرم خون ۶ قطعه مولد نر (وزن متوسط ۴۲۴/۳۷±۳۷/۸۴ گرم و طول متوسط ۳۶/۱۹±۱/۳۲ سانتی‌متر) و ۹ قطعه مولد ماده (وزن متوسط ۱۲۲۵/۸۷±۸۹/۴۷ گرم و طول متوسط ۵۰/۵±۰/۶ سانتی‌متر) ماهی سفیدک سیستان (*Schizothorax zarudnyi*)، مدت تحرک اسپرم‌ها در مخلوط مایع منی با نسبت‌های صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۵، ۹۰ و ۱۰۰ درصد مایع تخمدانی اندازه-گیری شد. اسپرم‌ها در محلول خالص مایع تخمدانی فاقد تحرک بودند. کمترین مدت تحرک اسپرم (۴۴/۶۷±۰/۵۶ ثانیه) با آب خالص و بیشترین مدت تحرک آن (۶۷±۵/۳۷ ثانیه) با ترکیب ۵۵٪ آب و ۴۵٪ مایع تخمدانی به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری با گروه‌های حاوی صفر، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ درصد مایع تخمدانی داشت ($P<0/05$). تفاوت‌هایی در ترکیب مایع تخمدانی، مایع منی و سرم خون مولدین وجود داشت. به جز منیزیوم، بقیه پارامترهای خون ماده و مایع تخمدانی و نیز تمامی ویژگی‌های خون مولدین نر و مایع منی با هم اختلاف معنی‌داری داشتند. همچنین، مقدار گلوکز، پروتئین کل و کلیسم سرم خون مولدین نر و ماده با هم اختلاف معنی‌داری داشتند. مقایسه ترکیبات مایع تخمدانی، مایع منی و سرم خونی مولدین نر و ماده نشان داد بیشترین گلوکز و پروتئین کل در سرم خون نر، بیشترین کلسترول و سدیم در سرم خون ماهی های نر و ماده، بیشترین کلسیم در سرم خون ماده، کمترین مقدار منیزیوم و بیشترین پتاسیم در مایع منی بود. نتایج نشان داد که وجود ۴۵٪ مایع تخمدانی در محلول فعال‌سازی موجب افزایش مدت تحرک اسپرم می‌شود. همچنین، نتایج مطالعه نشان‌دهنده نقش مهم جنس ماده در افزایش تحرک اسپرم در فرآیند لقاح ماهی سفیدک سیستان بود.

واژگان کلیدی: سفیدک سیستان، مایع تخمدانی، مایع منی، فراسنجه بیوشیمیایی، تحرک اسپرم.

مقدمه

ماهی سفیدک سیستان (*Schizothorax zarudnyi*) یکی از کپورماهیان بومی حوضه سیستان واقع در جنوب شرق ایران است. این ماهی در زیر خانواده Barbinae قرار گرفته است (Nelson *et al*., 2016) که مطالعه رئیسی عزیزی و همکاران (۱۳۹۳) نیز موید قرابت فیلوژنیک آن با باربوس ماهیان می-باشد. وقوع خشکسالی‌های متعدد و طولانی حوضه تالاب هامون، معرفی کپورماهیان غیربومی در دهه ۶۰ شمسی به این تالاب و از بین رفتن زیستگاه این گونه با ارزش، نسل آن را با خطر انقراض روبرو کرده است. با توجه به کاهش جمعیت این ماهی ارزشمند اقتصادی، در سنوات اخیر تکثیر مصنوعی جهت بازسازی و احیا ذخایر آن انجام می‌شود. جهت بهبود کارایی تکثیر، نیاز به مطالعات همه جانبه در زمینه تکنیک‌های تکثیر مصنوعی و مسائل مربوط به آن می‌باشد.

در ماهی سفیدک سیستان نیز همانند اغلب ماهی‌های استخوانی، تخمک‌های رسیده از فولیکول‌ها آزاد شده و درون حفره تخمدانی جای می‌گیرند. در این گونه‌ها که لقاح خارجی دارند، خروج تخمک‌ها از بدن همراه با خروج مایع تخمدانی می‌باشد (Jia *et al*., 2015). نقش مثبت مایع تخمدانی در فرآیند لقاح در بسیاری از گونه‌های آب‌شیرین و حتی دریایی به اثبات رسیده است (Wojtczak *et al*., 2007; Dietrich *et al*., 2008; Butts *et al*., 2012). در

ماهی آزاد چینوک *Oncorhynchus tshawytscha* ترکیب یون‌های غیرآلی (کلسیم و منیزیوم) مایع تخمدانی ارتباط معنی‌داری با ویژگی‌های حرکتی اسپرم این ماهی دارند (Rosengrave *et al*., 2009). در آزاد ماهیان ترکیب یون‌های سدیم، پتاسیم و کلسیم مایع تخمدانی متغیر می‌باشد و غلظت بالای یون سدیم توام با درصد لقاح پایین است (Lahnsteiner *et al*., 1995).

علاوه بر مواردی که در مورد اهمیت مایع تخمدانی به آن‌ها اشاره شد، حفظ و نگهداری گامت‌ها یکی از مواردی است که می‌تواند منجر به بهبود عملکرد مرکز تکثیر ماهی، کاهش همخونی و رفع مشکل رسیدگی غیرهمزمان مولدین شود (Bromage, 1995). پروتوکل‌های موفقی برای انجماد و نگهداری اسپرم ارائه شده است، ولی در مورد تخمک این امر محقق نشده است. تخمک ماهی دارای غشایی است که نفوذپذیری کمی نسبت به آب و مواد منجمد کننده دارد و نسبت به سرد شدن و انجماد نیز حساس است. به‌همین دلیل، تاکنون پروتوکل موفقیت‌آمیزی برای انجماد تخمک ماهی ارائه نشده است (Zhang *et al*., 2005; Guan *et al*., 2008, 2010; Tsai and Lin 2009). با این حال همواره تلاش می‌شود تا با شناخت ماهیت گامت‌ها و محیطی که در آن وجود دارند به اهدافی از قبیل حفظ بهینه آن‌ها دست یابند. شناخت ترکیبات مایع تخمدانی اطلاعات پایه‌ای برای نگهداری تخمک ماهی ارائه می‌دهد که در صورت نگهداری موفقیت-آمیز تخمک ماهی حتی برای مدت چند ساعت، افق-های جدیدی در آبزی‌پروری کپورماهیان گشوده می-شود چرا که حمل و نقل تخمک مانند آن‌چه که برای اسپرم وجود دارد امکان‌پذیر می‌شود.

از طرف دیگر، پلاسمای منی که توسط مجاری اسپرم ساخته و تولید می‌شود، محیطی یونی را فراهم می‌کند که موجب بقای اسپرم پس از آزاد شدن آن از بیضه‌ها می‌شود (Ciereszko, 2008). ترکیبات یونی موجود در پلاسمای منی شامل سدیم (Na^+)، پتاسیم (K^+)، کلسیم (Ca^{2+}) و منیزیم (Mg^{2+}) در دو فرآیند جلوگیری از تحرک اسپرم و یا فعال شدن تحرک آن دخیل هستند (Morisawa, 1985). اسپرماتوزای ماهی به‌علت ترکیبات شیمیایی منی، تا زمانی که درون این مایع قرار دارد، غیرمتحرک است. با توجه به اهمیتی که بالا بودن کیفیت اسپرم در آبزی‌پروری و تحقیقات آزمایشگاهی دارد، ترکیب شیمیایی اسپرم ماهیان استخوانی توسط تعداد زیادی از محققین مورد مطالعه قرار گرفته است که می‌توان به مطالعات صورت گرفته در ماهی‌های بنی *Barbus sharpeyi* (Alavi *et al*., 2010)، کاراس *Carassius gibelio* (Taati *et al*., 2010)، گطان *Barbus xanthopterus* (کرمی مطلق و همکاران، ۱۳۹۲) و کپور معمولی (مصباح و همکاران، ۱۳۹۵) اشاره نمود. تاکنون ترکیب مایع تخمدانی و ترکیبات سرم خون مولدین نر و ماده ماهی سفیدک سیستان مورد مطالعه قرار نگرفته است. در این مطالعه، مقدار برخی از ترکیبات آلی (گلوکز، کلسترول، پروتئین کل و آلبومین) و یونی (کلسیم، فسفر، منیزیوم، سدیم و پتاسیم) در مایع تخمدانی، مایع منی و سرم خون مولدین اندازه‌گیری و روابط بین آنها بررسی شد. همچنین، تاثیر مایع تخمدانی بر مدت تحرک اسپرم این ماهی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی: نمونه‌برداری‌های مطالعه حاضر در مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان بومی و گرمابی زهک (زهک، سیستان و بلوچستان) و همزمان با تکثیر مصنوعی ماهی سفیدک سیستان انجام شد. تکثیر مصنوعی این ماهی از طریق هورمون‌تراپی و طبق پروتوکل ارائه شده توسط راهداری و همکاران (۱۳۹۱) انجام گردید. به طور خلاصه، در این روش از هورمون اواپریم (Ovaprim®) که حاوی ۲۰ µg/mL GnRHa آزاد ماهیان و ۱۰ mg/mL آنتی‌دوپامین dompridone است برای القای تخم‌ریزی استفاده شد. تزریق اواپریم برای مولدین ماده در سه مرحله با مقادیر ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۵ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهی با فواصل ۲۴ ساعت بین دو مرحله صورت گرفت. مولدین نر همزمان با تزریق مرحله دوم ماده ها با دوز ۰/۳ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهی تزریق شدند. محل تزریق قاعده باله سینه ای بود.

از بین ذخیره مولدین موجود در مرکز که برای تکثیر مصنوعی مورد استفاده قرار گرفتند، تعداد ۹

جدول ۱ - وزن، طول و فاکتور وضعیت مولدین ماهی سفیدک سیستان (میانگین ± خطای استاندارد).

	مولدین ماده (n=۹)	مولدین نر (n=۶)
وزن بدن (گرم)	۱۲۲۵/۸۷±۸۹/۴۷	۴۲۴/۳۷±۳۷/۸۴
طول کل (سانتی‌متر)	۵۰/۵±۰/۶	۳۶/۱۹±۱/۳۲
فاکتور وضعیت	۰/۹۴±۰/۰۴	۰/۸۹±۰/۰۴

قطعه مولد ماده و ۶ قطعه مولد نر به‌طور تصادفی انتخاب شدند (جدول ۱). هنگام تخم‌کشی مولدین ماده، ابتدا بدن ماهی به‌وسیله حوله خشک و سپس تخمک‌ها با فشار ملایم محوطه شکمی روی یک صفحه مشبک نرم (قطر منافذ ۵۰ میکرون) ریخته می‌شدند و مایع تخمدانی که از منافذ عبور می‌کرد در ظرف دیگری جمع‌آوری می‌شد. حجم تخم خشک و نیز مایع تخمدانی جمع‌آوری شده از هر مولد با بشر اندازه‌گیری گردید. از مایع تخمدانی هر مولد تعداد سه نمونه برداشت و درون ویال‌های اپندورف ریخته - شد. به همین طریق، از منی ماهی‌ها نمونه‌گیری و سپس همه ویال‌ها در سرعت g ۳۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ (Sigma 1-14, Osterode am Harz, Germany) گردیدند. مایع جدا شده فوقانی تا زمان سنجش فراسنجه‌های بیوشیمیایی در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همچنین، در قسمت جداشده فوقانی pH نمونه‌ها بلافاصله اندازه-گیری گردید (WTW 340 pH Meter, Weilheim, Germany). فاکتور وضعیت (ضریب چاقی) مولدین از رابطه زیر محاسبه شد (Froese, 2006):

$$\text{ضریب چاقی} = \frac{W}{L3} \times 100$$

در این رابطه، W: وزن ماهی (g) و L: طول ماهی (cm) می‌باشد.

خون‌گیری: خون‌گیری از مولدین ماده و نر پس از تخم‌کشی و اسپرم‌گیری و در حالی که ماهی‌ها بیهوش بودند (مولدین در محلول حاوی ppm ۲۰۰ پودر گل میخک بیهوش شدند) با سرنگ ۲ میلی‌لیتری فاقد هپارین از سیاهرگ دمی انجام شد. برای تهیه سرم، نمونه‌های خون به‌مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۵۰۰ سانتریفوژ شدند. سرم به‌دست آمده تا زمان سنجش پارامترهای بیوشیمیایی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش پارامترهای بیوشیمیایی خون: مقادیر گلوکز، کلسترول، پروتئین کل، آلبومین، کلسیم، فسفر و منیزیوم با دستگاه اسپکتروفتومتر (Biochrom Libra S12 UV-Vis Spectrophotometer, Cambridge, England) توسط کیت‌های تشخیصی پارس آزمون (کرج، ایران) اندازه‌گیری شد. به این منظور، گلوکز و کلسترول به روش فتومتریک (آنزیمی، کالریمتری برای اندازه-گیری تک نقطه‌ای)، پروتئین کل طبق روش Biuret، آلبومین به روش بروموکرزول گرین، مطابق پروتکل ارائه شده توسط سازنده هر چهار مورد در طول موج ۵۴۶ نانومتر، کلسیم به روش فتومتریک با استفاده از Cresolphthalein Complexone در طول موج ۵۷۰ نانومتر، فسفر به‌روش فتومتریک UV test در طول موج ۳۴۰ نانومتر و منیزیوم به روش فتومتریک با استفاده از Xylidyl Blue در طول موج ۵۴۶ نانومتر اندازه‌گیری شد.

مقادیر سدیم و پتاسیم با دستگاه فلیم فتومتر (Elico Technologies CL 361, Hyderabad, India) اندازه‌گیری شدند. به این منظور، ابتدا استانداردسازی هر یون با استفاده از محلول‌های استاندارد (Chem-Lab NV, Zedelgem, Belgium) صورت گرفت و سپس، غلظت نمونه‌های رقیق شده توسط دستگاه خوانش و محاسبات لازم انجام شد.

سنجش مدت زمان تحرک اسپرم در نسبت های مختلف مایع تخمدانی: جهت بررسی تاثیر مایع تخمدانی بر مدت زمان تحرک اسپرم‌ها، مقدار µL ۲ مایع منی با نسبت‌های صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۵، ۹۰ و ۱۰۰ درصد مایع تخمدانی (مقدار آب هر یک از این نسبت‌ها به‌ترتیب ۱۰۰، ۸۵، ۷۰، ۵۵، ۴۰، ۲۵، ۱۰ و صفر درصد بود) و هر کدام با ۵ بار تکرار بر روی یک لام مخلوط گردید و بلافاصله در زیر میکروسکوپ (Leica DM IL LED, Wetzlar, Germany) تحرک اسپرم‌ها مشاهده شد. زمان سپری شده از شروع تحرک تا متوقف شدن آن‌ها به

جدول ۲ - فراسنجه‌های بیوشیمیایی مایع تخمدانی و سرم خون مولدین ماده ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi* (میانگین ± خطای استاندارد؛ n=۹).

	سرم خون	مایع تخمدانی	ضریب همبستگی	*P*-value
گلوکز (mg/dL)	۹۶ ± ۱/۹۵	۴۲/۷۲ ± ۱/۴۳	-۰/۴۴۴	۰/۱۱۲
کلسترول (mg/dL)	۱۷۱/۵۲ ± ۴/۸۷	۳۴/۸۹ ± ۱/۱۹	-۰/۳۰۵	۰/۲۸۹
پروتئین کل (g/dL)	۳/۴۹ ± ۰/۰۷	۱/۹۳ ± ۰/۰۳	-۰/۶۳۲*	۰/۰۱۵
آلبومین (g/dL)	۱/۹۵ ± ۰/۰۳	۱/۴۱ ± ۰/۰۱	۰/۰۱۱	۰/۹۷۱
کلسیم (mg/dL)	۹/۸۲ ± ۰/۱۲	۴/۸۴ ± ۰/۱۹	۰/۰۰۶	۰/۹۸۶
فسفر (mg/dL)	۷/۱۹ ± ۰/۲۲	۲/۵۳ ± ۰/۰۷	-۰/۴۳۵	۰/۱۲
منیزیوم (mg/dL)	۲/۶۲ ± ۰/۰۱	۲/۶۴ ± ۰/۰۲	۰/۱۶۲	۰/۵۸
سدیم (mmol/L)	۱۷۶/۴۴ ± ۵/۲۸	۱۴۸/۴۱ ± ۴/۴۶	۰/۵۸۸*	۰/۰۲۷
پتاسیم (mmol/L)	۳/۸۵ ± ۰/۲۹	۱۷/۱۴ ± ۱/۳۰	-۰/۴۴۳	۰/۱۱۲

علامت * و مقدار *P*-value نشان دهنده همبستگی معنی دار بین دو فراسنجه می‌باشد.

جدول ۳ - فراسنجه‌های بیوشیمیایی مایع منی و سرم خون مولدین نر ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi* (میانگین ± خطای استاندارد؛ n=۹).

	سرم خون	مایع منی	ضریب همبستگی	*P*-value
گلوکز (mg/dL)	۱۲۴/۴۸ ± ۳/۸۳	۱۵/۵۲ ± ۰/۲۱	۰/۳۹۵	۰/۷۴۲
کلسترول (mg/dL)	۱۵۹/۵۲ ± ۱۰/۸۷	۲۸/۳۸ ± ۲/۶۷	-۰/۱۹۳	۰/۸۷۷
پروتئین کل (g/dL)	۳/۸۹ ± ۰/۰۷	۱/۱۶ ± ۰/۰۴	۰/۰۰۴	۰/۹۹۸
آلبومین (g/dL)	۲ ± ۰/۰۳	۱/۳۴ ± ۰/۰۱	۰/۱۶۵	۰/۸۹۴
کلسیم (mg/dL)	۸/۴۱ ± ۰/۰۸	۴/۶۷ ± ۰/۴۴	۰/۹۹	۰/۰۹
فسفر (mg/dL)	۶/۳۵ ± ۰/۶۴	۱/۹۱ ± ۰/۱۹	-۰/۹۹۱	۰/۰۸۴
منیزیوم (mg/dL)	۲/۶۲ ± ۰/۰۲	۲/۵۴ ± ۰/۰۱	۰/۴۱۹	۰/۷۲۵
سدیم (mmol/L)	۱۶۲/۴۶ ± ۴/۶۳	۱۰۴/۹۷ ± ۵/۷۸	۰/۰۳۴	۰/۹۷۹
پتاسیم (mmol/L)	۳/۵۸ ± ۰/۲۹	۶۴/۷۱ ± ۳/۴۵	-۰/۵۵۸	۰/۲۵

دقت با کرونومتر بر حسب ثانیه ثبت شد. براساس اطلاعات موجود در مرکز تکثیر ماهی زهک، آب مخلوط شده با اسپرم دارای pH = ۸/۵۹، قلیائیت ۱۹۳/۳۳ میلی‌گرم در لیتر، سختی ۲۰۴ میلی‌گرم در لیتر بر حسب کربنالت کلسیم و EC ۵۶۸/۳۳ میکروزیمنس بر سانتی‌متر و دمای ۱/۵±۱۳ درجه سانتی‌گراد بود.

تحلیل داده‌ها: آنالیز داده‌ها به کمک نرم‌افزارهای Excel (Microsoft office 2016) و SPSS 19.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) انجام شد. برای بررسی میزان وابستگی بین مقادیر فراسنجه‌های سرم خون ماده و مایع تخمدانی و نیز سرم خون نر و مایع منی ضریب همبستگی پیرسون محاسبه شد. تاثیر مایع تخمدانی بر مدت تحرک اسپرم و مقایسه مقادیر فراسنجه‌ها با آنالیز یک طرفه Anova (one-way ANOVA) بررسی شد. جهت مقایسه ترکیبات سرم خون با مایع تخمدانی و مایع منی و نیز بین دو جنس نر و ماده از آزمون *t*-student استفاده شد. کلیه داده‌های متن به صورت میانگین±خطای استاندارد (mean±S.E) بیان شده‌اند.

نتایج

ارتباطی بین حجم کل تخم استحصال شده و حجم مایع تخمدانی نبود. در واقع، به این صورت نبود که هر چه حجم تخم بیشتر باشد، مقدار مایع تخمدانی هم بیشتر باشد. در برخی مولدین مقدار مایع تخمدانی با حجم تخم کمتر، بیشتر از مولدین با حجم تخم بیشتر بود. به‌طور کلی، مقدار مایع تخمدانی ۱۵-۱۰ درصد کل حجم تخمک استحصالی مولدین بود.

ترکیبات مایع تخمدانی، مایع منی و سرم خون: در ماهی ماده، مقدار همه پارامترهای اندازه‌گیری شده به جز منیزیوم و پتاسیم در سرم خون بیشتر از مایع تخمدانی بود. همچنین، بین پروتئین کل و سدیم سرم خون و مایع تخمدانی به ترتیب

جدول ۴ - همبستگی خطی بین فراسنجه‌های مایع تخمدانی (رنگ سایه) و خون (بدون رنگ) مولدین ماده ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi*.

	گلوکز	کلسترول	پروتئین	آلبومین	کلسیم	فسفر	منیزیوم	سدیم	پتاسیم
گلوکز	۱	۰/۱۴۳	۰/۶۹۳**	۰/۱۴۳	-۰/۲۹۹	۰/۶۴۹*	-۰/۰۹۶	۰/۱۰۲	۰/۲۵۱
کلسترول	-۰/۴۳۱	۱	۰/۵۱	۰/۴۳۵	۰/۷۴۸**	-۰/۴۷۳	۰/۵۵۷*	۰/۲۲۷	-۰/۱۵
پروتئین	۰/۴۲۷	۰/۴۷۳	۱	۰/۷۰۹**	۰/۰۳۵	۰/۴۳۵	-۰/۲۹۹	۰/۱۲۱	۰/۳۳۲
آلبومین	۰/۲۱۷	۰/۱۱۱	۰/۴۴۹	۱	-۰/۰۷۱	۰/۱۸۶	-۰/۳۵۴	-۰/۰۶	۰/۵۲۳
کلسیم	۰/۵۲*	-۰/۲۷۳	۰/۰۷	-۰/۱۰۵	۱	-۰/۶۱۸*	-۰/۱۳۹	۰/۲۸۳	-۰/۵۷۱
فسفر	۰/۰۵	۰/۱۱۹	۰/۲۲۵	۰/۱۳۸	-۰/۴۸*	۱	۰/۲۵۱	-۰/۱۲۳	۰/۴۴۲
منیزیوم	-۰/۲۶۹	-۰/۰۸۶	-۰/۶۲۶**	-۰/۲۹۲	۰/۱۳۳	-۰/۳۶۹	۱	-۰/۲۸۷	۰/۰۶
سدیم	-۰/۲۴۶	۰/۳۴۵	۰/۰۳۷	۰/۱۳۸	-۰/۰۶۲	۰/۰۱۷	-۰/۱۲	۱	-۰/۲۹۶
پتاسیم	۰/۳۷۳	-۰/۶۶۵**	-۰/۶۰۸**	-۰/۳۹۲	۰/۳۸۵	-۰/۴۴۷	۰/۳۵۲	-۰/۳۱	۱
pH	۰/۳۵۵	-۰/۰۳۵	۰/۵۵۸	-۰/۰۱	-۰/۴۷۹	۰/۴۵۲	۰/۳۳۷	-۰/۷۷*	۰/۲۸۳

** مقدار معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ ($P<0/01$).

* مقدار معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ ($P<0/05$).

جدول ۵ - همبستگی خطی بین فراسنجه های مایع منی (رنگ سایه) و خون (بدون رنگ) مولدین نر ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi*.

	گلوکز	کلسترول	پروتئین	آلبومین	کلسیم	فسفر	منیزیوم	سدیم	پتاسیم
گلوکز	۱	۰/۸۹۸	-۰/۳۵۵	۰/۵۰۳	۰/۹۹۸*	-۰/۳۲۷	-۰/۰۷۲	-۰/۹۹۹*	-۰/۳۹۵
کلسترول	۰/۹۹	۱	۰/۰۹۳	۰/۸۳۲	۰/۹۲۴	۰/۱۲۲	۰/۳۷۵	-۰/۸۸۲	۰/۰۵
پروتئین	۰/۰۳۸	-۰/۱۰۵	۱	۰/۶۲۹	-۰/۲۹۵	۱/۰۰*	۰/۹۵۸	۰/۳۸۷	۰/۹۹۹*
آلبومین	۰/۶۹۳	۰/۵۸۳	۰/۷۴۷	۱	۰/۵۵۷	۰/۶۵۲	۰/۸۲۶	-۰/۴۷۳	۰/۵۹۶
کلسیم	۰/۱۹۹	۰/۰۵۷	۰/۹۸۷	۰/۸۴۴	۱	-۰/۲۶۶	-۰/۰۰۸	-۰/۹۹۵	-۰/۳۳۵
فسفر	۰/۹۹۸*	۰/۹۷۹	۰/۰۹۸	۰/۷۳۵	۰/۲۵۷	۱	۰/۹۶۶	۰/۳۵۹	۰/۹۹۷*
منیزیوم	-۰/۶۹۳	-۰/۵۸۳	-۰/۷۴۷	-۱/۰۰**	-۰/۸۴۴	-۰/۷۳۵	۱	۰/۱۰۶	۰/۹۴۵
سدیم	-۰/۴۲۵	-۰/۲۹۲	-۰/۹۲۱	-۰/۹۴۷	-۰/۹۷۱	-۰/۴۷۹	۰/۹۴۷	۱	-۰/۲۳۳
پتاسیم	۰/۹۴۸	۰/۹۸۴	-۰/۲۸۱	۰/۴۲۹	-۰/۱۲۳	۰/۹۲۸	-۰/۴۲۹	-۰/۲۸۵	۱
pH	۰	۰/۱۴۳	-۰/۹۹۹*	-۰/۷۲۱	-۰/۹۸	-۰/۰۶	۰/۷۲۱	۰/۹۰۵	۰/۳۱۸

** مقدار معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ ($P<0/01$).

* مقدار معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ ($P<0/05$).

همبستگی منفی و مثبت وجود داشت (جدول ۲). در ماهی نر فقط مقدار پتاسیم در مایع منی بیشتر از سرم خون بود (جدول ۳). در واقع یون پتاسیم در هر دو جنس در مایع تخمدانی و مایع منی بسیار بیشتر از سرم خون بود. وجود همبستگی در بین برخی پارامترهای مایع تخمدانی، مایع منی و سرم خون در جدول‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است. مقایسه ترکیبات مایع تخمدانی، مایع منی و سرم خون مولدین نر و ماده در جدول ۷ ارائه شده است.

براساس نتایج آزمون *t*-student، بین همه پارامترهای سرم خون ماهی ماده و مایع تخمدانی به جز منیزیوم اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<0/01$) و بین همه پارامترهای سرم خون ماهی نر و مایع منی اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P<0/05$). مقایسه ترکیبات خونی مولدین ماده و نر نشان داد که میزان گلوکز، پروتئین کل و کلیسم دو جنس اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۶؛ $P<0/01$). مقدار pH مایع تخمدانی و مایع منی به ترتیب ۰/۰۲ ± ۸/۲۸ و ۰/۰۲±۸/۱۸ بود (n = ۸).

مدت تحرک اسپرم: کمترین مدت تحرک اسپرم (۰/۵۶±۴۴/۶۷ ثانیه) زمانی بود که فقط از آب به عنوان ماده فعال کننده اسپرم استفاده شد. بیشترین مدت تحرک (۵/۳۷ ± ۶۷ ثانیه) با ترکیب ۵۵٪ آب و ۴۵٪ مایع تخمدانی به دست آمد (شکل ۱).

جدول ۶ - مقایسه ترکیبات خون مولدین نر و ماده ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi* (میانگین ± خطای استاندارد؛ n=۹).

	ماهی ماده	ماهی نر	*t*	*df*	*P*-value
گلوکز (mg/dL)	۹۶ ± ۱/۹۵	۱۲۴/۴۸ ± ۳/۸۳	-۶/۲۱۷	۱۵	۰/۰۰۱
کلسترول (mg/dL)	۱۷۱/۵۲ ± ۴/۸۷	۱۵۹/۵۲ ± ۱۰/۸۸	۱/۰۳۱	۱۵	۰/۳۱۹
پروتئین کل (g/dL)	۳/۴۹ ± ۰/۰۷	۳/۸۹ ± ۰/۰۷	-۲/۷۱۳	۱۵	۰/۰۱۶
آلبومین (g/dL)	۱/۹۵ ± ۰/۰۳	۲ ± ۰/۰۳	-۱/۲۵۸	۸/۹۶۳	۰/۲۴
کلسیم (mg/dL)	۹/۸۲ ± ۰/۱۲	۸/۴۱ ± ۰/۰۸	۶/۱۲	۱۵	۰/۰۰۱
فسفر (mg/dL)	۷/۱۹ ± ۰/۲۲	۶/۳۵ ± ۰/۶۴	۱/۵۵	۱۵	۰/۱۴۲
منیزیوم (mg/dL)	۲/۶۲ ± ۰/۰۱	۲/۶۲ ± ۰/۰۲	-۰/۳۷۴	۱۵	۰/۷۱۴
سدیم (mmol/L)	۱۷۶/۴۴ ± ۵/۲۸	۱۶۲/۴۶ ± ۴/۴۳	۲/۰۲۹	۸/۹۵	۰/۰۷۳
پتاسیم (mmol/L)	۳/۸۵ ± ۰/۲۹	۳/۵۸ ± ۰/۲۹	۰/۴۲	۱۵	۰/۶۸۱

جدول ۷ - فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون مولدین ماده، نر، مایع تخمدانی و مایع منی ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi* (میانگین ± خطای استاندارد؛ n=۹).

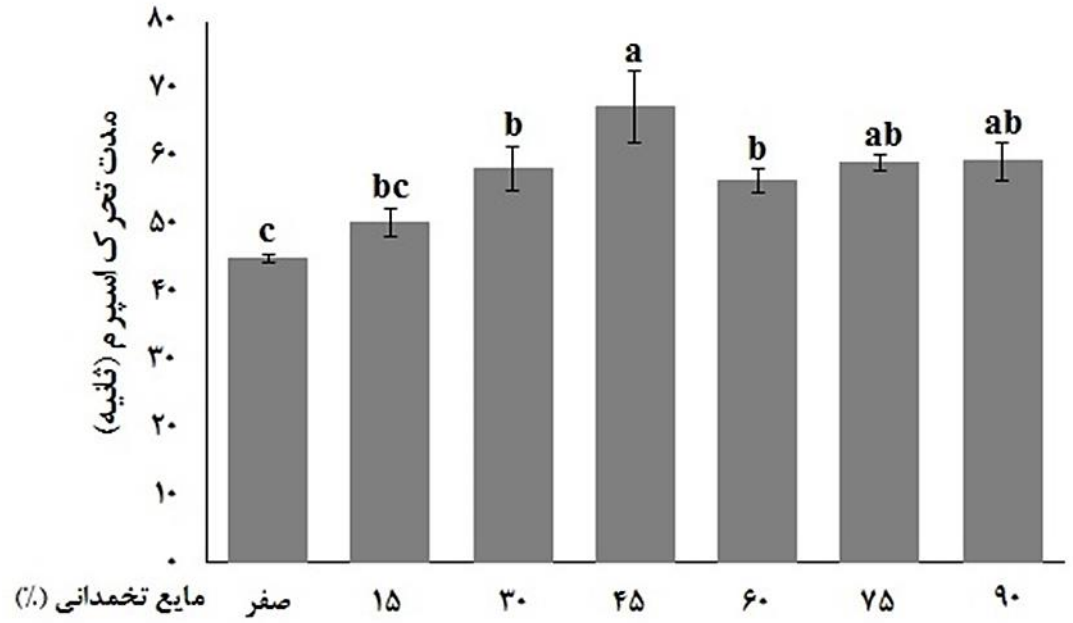
	سرم خون ماده	مایع تخمدانی	سرم خون نر	مایع منی
گلوکز (mg/dL)	۹۶ ± ۱/۹۵^{b}	۴۲/۷۲ ± ۱/۴۳^{c}	۱۲۴/۴۸ ± ۳/۸۳^{a}	۱۵/۵۲ ± ۰/۲۱^{d}
کلسترول (mg/dL)	۱۷۱/۵۲ ± ۴/۸۷^{a}	۳۴/۸۹ ± ۱/۱۹^{b}	۱۵۹/۵۲ ± ۱۰/۸۷^{a}	۲۸/۳۸ ± ۲/۶۷^{b}
پروتئین کل (g/dL)	۳/۴۹ ± ۰/۰۷^{b}	۱/۹۳ ± ۰/۰۳^{c}	۳/۸۹ ± ۰/۰۷^{a}	۱/۱۶ ± ۰/۰۴^{d}
آلبومین (g/dL)	۱/۹۵ ± ۰/۰۳^{a}	۱/۴۱ ± ۰/۰۱^{b}	۲ ± ۰/۰۳^{a}	۱/۳۴ ± ۰/۰۱^{b}
کلسیم (mg/dL)	۹/۸۲ ± ۰/۱۲^{a}	۴/۸۴ ± ۰/۱۹^{c}	۸/۴۱ ± ۰/۰۸^{b}	۴/۶۷ ± ۰/۴۴^{c}
فسفر (mg/dL)	۷/۱۹ ± ۰/۲۲^{a}	۲/۵۳ ± ۰/۰۷^{c}	۶/۳۵ ± ۰/۶۴^{b}	۱/۹۱ ± ۰/۱۹^{c}
منیزیوم (mg/dL)	۲/۶۲ ± ۰/۰۱^{a}	۲/۶۴ ± ۰/۰۲^{a}	۲/۶۲ ± ۰/۰۲^{a}	۲/۵۴ ± ۰/۰۱^{b}
سدیم (mmol/L)	۱۷۶/۴۴ ± ۵/۲۸^{a}	۱۴۸/۴۱ ± ۴/۴۶^{b}	۱۶۲/۴۶ ± ۴/۶۳^{ab}	۱۰۴/۹۷ ± ۵/۷۸^{c}
پتاسیم (mmol/L)	۳/۸۵ ± ۰/۲۹^{c}	۱۷/۱۴ ± ۱/۳۰^{b}	۳/۵۸ ± ۰/۲۹^{c}	۶۴/۷۱ ± ۳/۴۵^{a}

در هر ردیف وجود حداقل یک حرف مشابه بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار است ($P>۰/۰۵$).

بحث

ترکیبات مایع تخمدانی: مقدار pH مایع تخمدانی ماهی سفیدک سیستان ۸/۲۸±۰/۰۲ بود. pH قلیایی در گونه‌های متعدد آزاد ماهیان و کپورماهیان گزارش شده است (Wojtczak *et al*., 2007; Lahnsteiner *et al*., 2009). قلیایی بودن مایع تخمدانی به‌خاطر تثبیت نمودن محیط اطراف تخمک در شرایط تخم‌ریزی طبیعی اهمیت زیادی دارد (Lahnsteiner *et al*., 1995; Lahnsteiner, 2000). در ماهی سفیدک سیستان مایع تخمدانی ۱۵-۱۰ درصد کل حجم تخمک و مایع خارج شده از بدن ماهی را تشکیل می‌دهد. بنابراین، حتی احتمال دارد که ترکیب این مایع بر محیط ریز اطراف میکروپیل تاثیر بگذارد و در تنظیم روابط متقابل بین اسپرم-تخمک دخیل باشد (Jia *et al*., 2015). در ماهیان استخوانی آب‌شیرین ترکیب مایع تخمدانی برآورد خوبی از کیفیت تخمک ارائه می‌دهد. در کپور معمولی، کپور نقره‌ای و کپور علفخوار، pH مایع تخمدانی، مقدار پروتئین و فعالیت aspartate aminotransferase به‌شدت با درصد لقاح ارتباط دارند. در واقع، یکسری از مطالعات بر روی ترکیب مایع تخمدانی ماهی‌ها انجام می‌شود تا براساس ترکیب آن به کیفیت تخمک ماهی پی ببرند (Cabrita *et al*., 2009). در این مطالعه، ترکیب مایع تخمدانی فقط در یک مقطع زمانی اندازه‌گیری شد ولی در صورتی که در طول فصل تخم‌ریزی سنجش شود، شاهد تغییرات در ترکیب آن خواهیم بود. این تغییرات به دلایل تفاوت در زمان سپری شده از اوولاسیون و مدت زمان ماندن تخمک‌ها درون بدن ماهی، وضعیت فیزیولوژیک مولد ماده و کیفیت تخمک می‌باشد (Lahnsteiner, 2000).

ترکیبات مایع منی: مقدار گلوکز در مایع منی ماهی



شکل ۱ - مقایسه مدت تحرک اسپرم در نسبت های مختلف مایع تخمدانی و مایع منی. وجود حداقل یک حرف مشابه بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار است ($n = ۵$؛ $P>۰/۰۵$).

سفیدک سیستان (۱۵/۵۲±۰/۲۱ میلی‌گرم در دسی لیتر) که کمتر از مقدار گزارش شده در ماهی گطان (۲۳/۳±۰/۱ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) بود (کرمی مطلق و همکارن، ۱۳۹۲). گلوکز قند اصلی در مایع منی است. از طرف دیگر، وجود این کربوهیدرات در مایع منی به نیاز بالای انرژی گنادهای ماهی نر در طول مرحله ساخت اسپرم‌ها (اسپرماتوژنز) ارتباط دارد (Soengas *et al*., 1993). در مطالعه حاضر مقدار پروتئین کل در مایع منی بسیار کمتر از مقدار آن در خون بود. یک قاعده عمومی وجود دارد که در ماهیان استخوانی غلظت پروتئین مایع منی نسبت به خون بسیار کمتر است (Ciereszko *et al*., 2000a, b) که نتایج مطالعه ما نیز مطابق این قاعده می‌باشد. مقدار پروتئین و ترکیبات آلی مایع منی ماهی در مقایسه با مهره‌داران عالی‌تر کم می‌باشد. پروتئین‌های موجود در مایع منی نقش مهمی در انجام لقاح دارند (Mansour *et al*., 2008) و باعث افزایش بقای اسپرم ماهی می‌شوند (Lahnsteiner *et al*., 2004). در ماهی سفیدک سیستان مقدار کلسترول در هنگام نمونه‌برداری (۲۸ /۳۸±۲/۶۷ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) که مصادف با فصل تخم‌ریزی این ماهی بود، تقریباً دو برابر مقدار گزارش شده در ماهی کپور (۱۴/۱۲±۱۲/۷۳ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) بود (محمدی و همکاران، ۱۳۹۶). کلسترول موجود در مایع منی علاوه بر نقش حفاظتی برای اسپرم‌ها (Hatef *et al*., 2007)، منبع تولید هورمون‌های استروئیدی می‌باشد (Milla *et al*., 2009). انواع مختلف چربی‌ها در مایع منی ماهی‌های گزارش شده که مقدار هر نوع برحسب گونه ماهی فرق می‌کند، به عنوان مثال در کپور علفخوار مقدار آن ۰/۳۷ میلی-گرم در لیتر گزارش شده است (Bozkurt *et al*., 2009).

به‌طور کلی، در ماهی سفیدک سیستان غلظت یون‌های تک ظرفیتی (سدیم و پتاسیم) بیشتر از یون‌های دو ظرفیتی (کلسیم و منیزیوم) بود. چنین نتیجه‌ای در ماهی سیم نیز مشاهده شده است. علاوه بر این، در ماهی سفیدک سیستان، در بین یون‌های تک ظرفیتی، مقدار سدیم غالب بود که با نتیجه به دست آمده در ماهی گطان مطابقت دارد، ولی در بین یون‌های دو ظرفیتی، برخلاف گطان، مقدار کلسیم بیشتر از منیزیوم بود (کرمی مطلق و همکارن، ۱۳۹۲). غلظت بالای یون‌های سدیم و پتاسیم در ماهی گطان (به‌ترتیب ۴۳۲/۴±۷۹/۲ و ۱۰۸/۸±۲۰/۲ میلی مول در لیتر) از دلایل زیاد بودن مدت تحرک اسپرم (۳۰۹/۲±۶۴/۵ ثانیه) این ماهی ذکر شده که در مقایسه با طول مدت تحرک اسپرم در ماهی سفیدک سیستان (۶۷±۵/۳۷ ثانیه) بسیار بیشتر است. با این حال، مطالعات Lahnsteiner و همکاران

(۱۹۹۶) نشان دادند که طول مدت تحرک اسپرم با مقدار سدیم رابطه مثبت و با مقدار پتاسیم رابطه منفی دارد. همچنین، نسبت سدیم به پتاسیم در ماهی سفیدک سیستان ۱/۶۲ بود که تقریباً مشابه نسبت مشاهده شده در ماهی آلبرنوس (۱/۶۴) ولی نسبت به کپور معمولی (۰/۹) بیشتر بود (Alavi and Cosson, 2006). مطالعات صورت گرفته نشان دهنده تفاوت ترکیب یونی مایع منی ماهیان مختلف می‌باشد. برای مثال، مایع منی ماهی سفیدک سیستان دارای سدیم بیشتری نسبت به کپور معمولی *Cyprinus carpio* (۵۸-۷۱ mM) (Kruger *et al*., 1984)، لای ماهی *Tinca tinca* (۱۸/۴۱ mM) (Linhart *et al*., 2003) و باربوس معمولی *Barbus barbus* (۷۰-۷۶ mM) (Alavi *et al*., 2008a, b) است ولی نسبت به ماهی سوف *Perca fluviatilis* (۱۲۴ mM) (Lahnsteiner *et al*., 1995) و گربه ماهی آسیایی *Clarias macrocephalus* (۱۶۴ mM) (Tan-Fermin *et al*., 1999) مقدار آن کمتر است. در مورد سایر یون-ها و ترکیبات نیز چنین تفاوت‌هایی وجود دارد. این تفاوت‌ها می‌تواند به‌دلیل خصوصیات خاص هر گونه باشد (Ciereszko *et al*., 2000a). یون‌های موجود در مایع منی از طریق دخالت در ترکیب یونی درون سلولی اسپرم یا تنظیم اسمولاریته آن در تنظیم تحرک اسپرم دخالت دارند (Billard and Cosson, 1992). واکنش این یون‌ها با غشای اسپرم، بر توانایی غشای آن تاثیر می‌گذارد و مکانیسمی برای حفظ اسپرماتوزوا درون پلاسمای منی فراهم می‌کند و توانایی تحرک اسپرم را قبل از آزاد شدن آن به محیط اطراف و خارج حفظ می کند (Ciereszko *et al*., 2000a).

مقدار pH مایع منی در این مطالعه ۸/۱۸±۰/۰۲ بود که بیشتر از pH اندازه گیری شده در ماهی گطان (۷/۶۶) بود (کرمی مطلق و همکارن، ۱۳۹۲). pH بر ویژگی حرکتی اسپرم کپور ماهیان تاثیر می‌گذارد (Alavi and Cosson, 2006). در ماهی مروارید *Alburnus alburnus*، ارتباط مستقیمی بین pH مایع منی و درصد اسپرم‌های متحرک گزارش شده است (Lahnsteiner *et al*., 1996).

ترکیبات سرم خون: در مطالعه حاضر، ترکیبات سرم خون دو جنس نر و ماده فقط در مقطع زمانی تخم‌ریزی مورد سنجش قرار گرفته‌اند. مواد مغذی سنجش شده شامل گلوکز و پروتئین در دو جنس نر و ماده با هم تفاوت معنی‌دار داشتند. اندازه‌گیری غلظت گلوکز یکی از شاخص‌های اندازه گیری استرس می‌باشد. در مطالعه حاضر مقدار گلوکز در سرم خون مولدین نر بیشتر از ماده بود. شاید بتوان گفت چون مولدین نر از نظر اندازه کوچک‌تر از مولدین ماده بودند و در هنگام تکثیر به‌طور نسبی بیهوش می-شدند، در نتیجه میزان تقلای آن‌ها در زمان دستکاری بیشتر بوده و در نتیجه استرس وارده به آن‌ها بیشتر بود. با این حال، در منابع تفاوت خاصی بین مقدار گلوکز جنس ماده و نر ذکر نشده است (Bhatnagar and Saksena, 1989; Edsall 1999).

مطالعات Luskova (۱۹۹۷ و ۱۹۹۸) مقدار پروتئین کل را طی یک سال در دو جنس نر و ماده برخی ماهی ها مطالعه نمود. مطالعات وی نشان داد که در آزادماهی بلند باله *Thymallus thymallus* مقدار پروتئین کل در جنس نر و ماده با هم تفاوت دارد ولی در قزل آلای قهوه‌ای *Salmo trutta fario* و *Leuciscus cephalus* هیچ تفاوتی بین دو جنس وجود نداشت. از طرف دیگر، بیشتر محققین اتفاق نظر دارند که کمترین غلظت پروتئین کل در طول فصل تولیدمثل وجود دارد و این مورد در گونه‌های متعدد از قبیل قزل آلای رنگین کمان (Miller *et al*., 1983)، کپور معمولی و ماهی‌های علفخوار (Kovacheva and Tchekov, 1993)، اردک ماهی *Esox lucius* (Lenhardt, 1992) و گربه ماهی *Silurus glanis* (Svobodová *et al*., 1997) به اثبات رسیده است.

تاثیر مایع تخمدانی بر تحرک اسپرم: در مطالعه حاضر، برای ایجاد تحرک در اسپرم‌ها، از آب معمولی سالن تکثیر استفاده شد. دمای آب در هنگام انجام مطالعه (اواخر اسفند و اوایل فروردین) ۱۳±۱/۵ درجه سانتی‌گراد بود. در واقع، دمای تکثیر در ماهی سفیدک سیستان پایین‌تر از ماهیانی از قبیل کپور معمولی و کپورماهیان چینی است. هر چند دمای پایین با کاهش دادن سرعت حرکت اسپرم، مدت تحرک آن را افزایش می‌دهد (Cosson *et al*.,

1985) ولی تاثیر دما بر تحرک اسپرم به لحاظ فیزیولوژیک کم و بیش به سازگاری گونه ماهی با شرایط طبیعی محیطی که در آن زندگی می‌کند بستگی دارد (Alavi and Cosson, 2005). همچنین، pH آب مورد استفاده ۸/۵۹ بود که اندکی بالاتر از pH مایع تخمدانی و مایع منی بود. آب مورد استفاده در مرکز تکثیر ماهی سفیدک سیستان از مخازن چاه نیمه‌های سیستان تامین می‌شود که معمولا pH بالای ۸ دارد. به طور کلی pH آب می‌تواند بر غشای سلول تاثیر گذاشته و موجب تحرک اسپرم شود (Morisawa and Morisawa, 1988). pH پایین مایع منی مانع تحرک اسپرم می‌باشد ولی وقتی در تماس با محیط بیرونی که محلول فعال کننده اسپرم است قرار گیرد تغییر می‌کند و فعالیت اسپرم شروع می‌شود چون فرآیندهای که در مایع منی مانع حرکت اسپرم بود را تحت تاثیر و تغییر قرار می‌دهد (Ingermann *et al*., 2008). pH مناسب برای محلول‌های فعال‌سازی برخی گونه‌ها از جمله کپور، pH قلیایی (۸) بیان شده است (Perchec *et al*., 1995).

در ماهی سفیدک سیستان اسپرم در مایع تخمدانی به تنهایی فاقد تحرک بود که احتمالاً به‌دلیل یکسان بودن اسمولاریته مایع تخمدانی و مایع منی می‌باشد ولی وقتی که مایع تخمدانی و آب با هم مخلوط شدند تحرک اسپرم نسبت به زمانی که آب به تنهایی به اسپرم اضافه شد بیشتر بود. نتایج مطالعه حاضر با مطالعات قبلی مبنی بر اینکه مایع تخمدانی به دلیل افزایش تحرک اسپرم برای لقاح مفید است، همخوانی دارد (Turner and Montogomerie, 2002; Urbach *et al*., 2005; Elofsson *et al*., 2006; Wojtczak *et al*., 2007; Rosengrave *et al*., 2009). Diogo و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کرده‌اند که وجود مقدار معینی از مایع تخمدانی (۲۵ درصد) در مایع فعال کننده، موجب بهبود تحرک اسپرم می‌گردد. وجود مایع تخمدانی در محلول‌های فعال‌سازی باعث طول عمر اسپرم در گونه‌های آب شیرین می‌شود (Turner and Montgomerie, 2002; Urbach *et al*., 2005; Wojtczak *et al*., 2007; Dietrich *et al*., 2008) و حتی ممکن است موجب بهبود خصوصیات حرکتی اسپرم از قبیل سرعت، مسیر و الگوی حرکتی آن گردد (Lahnsteiner *et al*., 1996). این یافته‌های علمی موید این مطلب است که جنس ماده نقش مهمی در عمل لقاح و در پروسه تحرک اسپرم دارد و در واقع مایع تخمدانی یکی از فاکتورهای بیولوژیک مهم می‌باشد که موجب بهبود تحرک اسپرم می‌شود. مکانیسم دقیق چگونگی تاثیر مایع تخمدانی بر تحرک اسپرم ناشناخته است ولی احتمالاً این تاثیر به ترکیب فیزیکوشیمیایی مایع تخمدانی مربوط می‌باشد. این ترکیب نه تنها بین گونه‌های مختلف به شدت متفاوت است، بلکه حتی بین افراد یک گونه نیز به‌دلایلی از قبیل وضعیت فیزیولوژیک، میزان رسیدگی جنسی و کیفیت تخم متفاوت است (Lahnsteiner, 2009). مایع تخمدانی مخلوطی از چند هورمون، ماده مغذی و مواد متابولیک می‌باشد که همانند بستری برای وظایف و کارکردهای فیزیولوژیک اسپرماتوزا عمل می‌کند. در قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، pH مایع تخمدانی موجب افزایش تحرک اسپرم می‌شود (Wojtczak *et al*., 2007). مکانیسم دیگر تاثیر مایع تخمدانی این است که با خصوصیاتی که دارد اسمولاریته منطقه ریز محل انجام لقاح (محل ورود اسپرم به تخمک) را تغییر می‌دهد و به این طریق بر مدت تحرک اسپرم تاثیر می‌گذارد (Lahnsteiner *et al*., 1995; Westin and Nissling, 1991; Wojtczak *et al*., 2007). حتی در برخی گونه‌ها گفته شده که درون مایع تخمدانی جاذب‌های شیمیایی که توسط تخمک تولید می‌شود وجود دارد (Urbach *et al*., 1995). این جاذب‌ها مسیر حرکت سلول‌های متحرک را به سمت تخمک تسهیل می‌کنند. ترکیب یونی مایع تخمدانی نیز بر تحرک و سرعت اسپرم تاثیر می‌گذارند. مکانیسم‌هایی که به آنها اشاره شد مربوط به افزایش تحرک اسپرم می‌باشد و مکانیسم واقعی تاثیر مایع تخمدانی ناشناخته است. اینکه مایع تخمدانی در غلظت پایین بر تحرک اسپرم تاثیر می‌گذارد مطابق با چیزی است که در محیط طبیعی اتفاق می‌افتد. هنگامی که ماهی ماده و نر در محیط طبیعی اقدام به تخم‌ریزی و اسپرم‌ریزی می‌کنند، غلظت مایع تخمدانی کاهش می یابد و در واقع با آب محیط رقیق می‌شود.

نتیجه‌گیری

مطالعه ما علاوه بر این‌که حاکی از وجود تفاوت‌هایی بین ترکیب شیمیایی مایع تخمدانی و مایع منی و نیز ترکیبات سرمی خون نر و ماده بود، نشان داد وجود مایع تخمدانی همراه به محلول فعال‌سازی که می-تواند آب باشد، باعث افزایش مدت تحرک اسپرم ماهی سفیدک سیستان می‌گردد. بنابراین، در زمان عملیات تکثیر مصنوعی نه تنها نیاز به جداسازی مایع تخمدانی نیست، بلکه مخلوط آن با آب یا محلول های فعال کننده موجب بهبود تحرک اسپرم و درصد لقاح خواهد شد. اگرچه لازم است بررسی‌های بیشتری از قبیل تعیین درصد تحرک اسپرم‌ها صورت پذیرد تا این نتیجه‌گیری با صحت بیشتر قابل ارائه باشد.

تشکر و قدردانی

از مدیرکل و معاونت محترم آبزی‌پروری اداره کل شیلات آب‌های داخلی سیستان و بلوچستان که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند و پرسنل عزیز مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان بومی و گرمابی زهک که همکاری صمیمانه‌ای داشتند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

راهداری ع.، قرایی ا.، غفاری م.، نجفی ت. ۱۳۹۱. بیوتکنیک تکثیر مصنوعی ماهی سفیدک سیستان (*Schizothorax zarudnyi*) در حوضه آبی سیستان. نشریه علوم آبزی‌پروری ۱(۱): ۸۲-۷۳.

رئیسی عزیزی م.، قرایی ا.، غفاری م. ۱۳۹۳. بررسی روابط فیلوژنی باربوس ماهیان جنوب ایران بر اساس توالی ژنی سیتوکروم *b*. ژنتیک نوین ۸(۳): ۳۲۰-۳۱۳.

کرمی مطلق ا.، اسکندری غ.، خدادادی م.، جافریان ا. ۱۳۹۲. ریخت شناسی اسپرم و برخی متغیرهای شیمیایی مایع منی ماهی گطان *Barbus xanthoptenus* Heckel, 1843. پژوهش‌های ماهی شناسی کاربردی ۱(۱): ۲۸-۱۵.

محمدی ق.، مصباح م.، خواجه غ.، ممبینی آ. ۱۳۹۶. اثرات پروتئین تام و کلسترول بر خصوصیات اسپرم شناختی منی ماهی کپور معمولی پرورش. مجله علوم و فنون دریایی ۱۶(۱): ۷۵-۶۶.

Affonso E., Polez V., Correa C., Mazon A., Araujo M., Moraes G., Rantin F. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 133, 375-382.

Alavi S.M.H., Psenicka M., Policar T., Linhart O. 2008a. Morphology and fine structure of *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology* 24, 378-381.

Alavi S.M.H., Psenicka M., Rodina M., Policar T., Linhart O. 2008b. Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season. *Aquatic Living Resources* 21, 75-80.

Alavia S.M.H., Cosson J. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ionsand osmolality: A review. *Cell Biology International* 30, 1-14.

Alavi S., Cosson J. 2005. Sperm motility in fishes. (I) Effects of temperature and pH: A review. *Cell Biology International* 29, 101-110.

Bhatnagar S., Saksena D.N. 1989. Observations on certain haematological and biochemical parameters of blood in an air-breathing teleost, *Clarias batrachus* (L). *The Journal of Animal Morphology and Physiology* 36, 163-168.

Billard R., Cosson M.P. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology* 261, 122-131.

Bromage N. 1995. Broodstock Management and Egg and Larval Quality, Blackwell, Oxford, UK. pp. 1-25.

Butts I.A.E., Johnson K., Wilson C.C., Pitcher T.E. 2012. Ovarian fluid enhances sperm velocity based on relatedness in lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Theriogenology* 78, 2105-2109.

Cabrita E., Robles V., Herráez M.P. 2009. Egg quality determination in teleost fish. In: Cabrita, E., Robles, V., Herráez, M.P. (Eds.), Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. Biology Series. CRC Press (Taylor and Francis Group), Boca Raton, Florida, USA, pp. 149-182.

Ciereszko A. 2008 Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation success in fish. In: Fish Spermatology, Alavi S.M.H., Cosson J., Coward R., Rafiee G. (Eds.), Alpha Science Ltd: Oxford. pp. 215-240.

Comparative Biochemistry and Physiology 151A, 651-656.

Jia Y.D., Niu H.X., Meng Z., Liu X.F., Lei J.L. 2015. Biochemical composition of the ovarian fluid and its effects on the fertilization capacity of turbot *Scophthalmus maximus* during the spawning season. *Journal of Fish Biology* 86, 1612-1620.

Kovacheva N.P., Tchekov A.G. 1993. Physiological method for a control of the brood fish maturity before and after spawning. Proc. 3rd Ichthyohaematol. Conf., RIFCH Vod Àany. pp. 64-67.

Kruger J.C., Smith G.L., Van Vuren J.H.J., Ferreira J.T. 1984. Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology* 24, 263-272.

Lahnsteiner F. 2000. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the over-ripening of rainbow trout eggs. *Fish Physiology and Biochemistry* 23, 107-118.

Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T., Patzner R.A. 1995. Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch. *Journal of Fish Biology* 47, 492-508.

Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T., Patzner R.A. 1996. Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. *Fish Physiology and Biochemistry* 15, 167-179.

Lahnsteiner F., Mansour N., Berger B. 2004. Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology* 62, 801-808.

Lahnsteiner F., Soares F., Ribeiro L., Dinis M.T. 2009. Egg quality determination in teleost fish. In: Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P. Methods in Reproductive Aquaculture. Marine and Freshwater Species. CRC Press. Boca Raton, 149-180.

Lahnsteiner F., Weisman T., Patzner R.A. 1995. Composition of the ovarian fluid in 4 salmonid species: *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta f. lacustrus*, *Salvelinus lacustris* and *Hucho hucho*. *Reproduction Nutrition Development* 35, 465-474.

Lenhardt M. 1992: Seasonal changes of some blood chemistry parameters and in relative liver and gonad weights of pike (*Esox lucius*, L.) from the River Danube. *Journal of Fish Biology* 40, 709-718.

Linhart O., Rodina M., Bastl J., Cosson J. 2003. Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with

Ciereszko A., Glogowski J., Dabrowski K. 2000a. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: Tiersch, T.R., Mazik, P.M. (Eds), Cryopreservation in Aquatic Species, World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, pp. 20-48.

Ciereszko A., Kwasnik M., Dabrowski K., Piros B., Glogowski J. 2000b. Chromatographic separation of trypsin-inhibitory activity of rainbow trout blood and seminal plasma. *Fish and Shellfish Immunology* 10, 91-94.

Cosson M.P., Billard R., Gatti J.R., Christen R. 1985. Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy. *Aquaculture* 46, 71-75.

Dietrich G.J., Wojtczak M., Slowinska M., Dobosz S., Kuzminski H., Ciereszko A. 2008. Effects of ovarian fluid on motility characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology* 24, 503-507.

Edsall C.C. 1999. A blood chemistry profile for lake trout. *Journal of Aquatic Animal Health* 11, 81-86.

Diogo P.F., Soares F., Dinis M.T., Cabrita E. 2010. The influence of ovarian fluid on *Solea senegalensis* sperm motility. *Applied Ichthyology* 26, 690-695.

Elofsson H., Van Look K.J.W., Sundell K., Sundh H., Borg B. 2006. Stickleback sperm saved by salt in ovarian fluid. *Journal of Experimental Biology* 209, 4230-4237.

Froese R. 2006. Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology* 22, 241-253.

Guan M., Rawson D.M., Zhang T. 2008. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols. *Cryobiology* 56, 204-208.

Guan M., Rawson D.M., Zhang T. 2010. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. *CryoLetters* 56, 204-208.

Hatef A., Niksirat H., Mojazi Amiri B., Alavi S.M.H., Karami M. 2007. Sperm density, seminal plasma composition and their physiological relationship in the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Aquaculture Research* 38, 1175-1181.

Ingermann R.L., Holcomb M., Zuccarelli M.D., Kanuga M.K., Cloud J.G. 2008. Initiation of motility by steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: Membrane ion exchangers and pH sensitivity.

Taati M.M., Mehrad B., Shabani A., Golpour A. 2010. Correlation between chemical composition of seminal plasma and sperm motility characteristics of Prussian carp (*Carassius gibelio*). *Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation* 3, 233-238.

Tan-Fermin J.D., Miura T., Adachi S., Yamauchi K. 1999. Seminal plasma composition, sperm motility and milt dilution in the Asian catfish *Clarias microcephalus* (Gunther). *Aquaculture* 171, 323-338.

Tsai S., Lin C. 2009. Effects of cryoprotectant on the embryos of banded coral shrimp (*Stenopus hispidus*), preliminary studies to establish freezing protocols. *CryoLetters* 30, 373-381.

Turner, E., Montogomerie, R. 2002. Ovarian fluid enhances sperm movement in Artic charr. *Journal of Fish Biology* 60, 1570-1579.

Urbach D., Folstad I., Rudolfsen G. 2005. Effects of ovarian fluid on sperm velocity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 57, 438-444.

Westin L., Nissling A. 1991. Effects of salinity on spermatozoa motility, percentage of fertilized eggs and egg development of Baltic cod (*Gadus morhua*), and implications for cod stock fluctuations in the Baltic. *Marine Biology* 108, 5-9.

Wojtczak M., Dietrich G.J., Słowińska M., Dobosz S., Kuźmiński H., Ciereszko A. 2007. Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Aquaculture* 270, 259-264.

Zhang T., Isayeva A., Adams S.L., Rawson D.M. 2005. Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology* 50, 285-293.

characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca*). *Journal of Applied Ichthyology* 19, 177-181.

Lusková V. 1997. Influence of spawning on enzyme activity in the blood plasma of fish. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* 44, 57-66.

Lusková, V. 1998. Factors affecting haematological indices in free-living fish populations. *Acta Veterinaria Brno* 67, 249-255.

Mansour N., Richardson G.F., McNiven M.A. 2008. Effect of Seminal Plasma Protein on Post thaw Viability and Fertility of Arctic Char Spermatozoa. *North American Journal of Aquaculture* 70, 1, 92-97.

Milla S., Wang N., Mandiki S.N.M., Kestemont P. 2009. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? *Comparative Biochemistry and Physiology* 153, 242-251.

Miller W.R., Hendricks A.C., Cairns J.Jr. 1983. Normal ranges for diagnostically important hematological and blood chemistry characteristics of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 40, 420-425.

Morisawa S., Morisawa M. 1988. Induction of potential for sperm motility by bicarbonate and pH in rainbow trout and chum salmon. *The Journal of Experimental Biology* 136, 13-22.

Morisawa M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Journal of Zoological Science* 2, 605-615.

Nelson J.S., Grande T.C., Wilson M.V.H. 2016. Fishes of the World. John Wiley & Sons, Fifth edition. 752 p.

Perchec G., Jeulin C., Cosson J., André F., Billard R. 1995. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science* 108, 747-753.

Rosengrave P., Montgomerie R., Metcalf V.J., McBride K., Gemmell N.J. 2009. Sperm traits in Chinook salmon depend upon activation medium: implications for studies of sperm competition in fishes. *Canadian Journal of Zoology* 87, 920-927.

Soengas J.L., Sanmartin B., Barciela P., Aldegunde M., Rozas G. 1993. Changes in carbohydrate metabolism in domesticated rainbow trout Oncorhynchus mykiss related to spermatogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology* 105, 665-671.

Svobodová Z., Koláová J., KouIl J., Hamáâková J., Vykusová B., Kaláb P. 1997. Haematological investigations in *Silurus glanis* L. females during pre- and post-spawning period. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* 44, 67-81.

Comparison of ovarian fluid, semen and blood biochemical composition of snow trout *Schizothorax zarudnyi* broods and evaluation the effect of ovarian fluid on sperm motility

Abdolali Rahdari*[1], Ahmad Gharaei[1], Reza Fadaei[2], Mortaza Jahantab[2], Abbas Alizadeh[3]

[1]Department of Fisheries, Hamoun International Wetland Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.
[2]Zahak Fish Hatchery Center, Zahak, Iran.
[3]Duty of Aquaculture, General Directorate Office of Fisheries-Sistan, Zabol, Iran.
*Corresponding author: rahdari57@uoz.ac.ir

Received: 2019/8/15 Accepted: 2019/11/18

Abstract

This study was investigated organic (glucose, cholesterol, total protein and albumin) and ionic (calcium, phosphorus, magnesium, sodium and potassium) composition of the ovarian fluid and blood serum of 6 males (mean weight 424.37±37.84 g and mean length 36.19±1.32 cm) and 9 females (mean weight 1225.87±89.47 g and mean length 50.5±0.6 cm) of snow trout *Schizothorax zarudnyi* broods. Also, the sperm motility duration in combination of seminal fluid with 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 and 100% of ovarian fluid was measured. The ovarian fluid solution alone (100%) did not increase sperm motility. The shortest duration of sperm motility (44.67±0.56 s) with pure water and the highest duration of motility (67±5.37 s) was obtained by combining 55% water and 45% ovarian fluid that showed significant different with groups contain 0, 15, 30 and 60% of the ovarian fluid ($P<0.05$). There were differences in the composition of ovarian fluid, semen and blood serum. With the exception of magnesium, all other parameters of the female blood and ovarian fluid and all male blood and semen parameters were significantly different. Inaddition, there was a significant difference in the glucose, and total protein between blood serum of males and females. Comparison composition of the ovarian fluid, seminal fluid and blood serum of female and male broods showed the highest glucose and total protein in blood male serum, highest cholesterol and sodium in female and male blood serum, highest calcium in female blood serum, lowest magnesium and highest potassium in seminal fluid. The results showed increasing of the sperm motility duration with ovarian fluid at median concentrations in the activation medium. Also, the results revealed a possible important female contribution to sperm motility enhancement during the fertilization process in *S. zarudnyi*.

Keywords: Snow trout, Ovarian fluid, Seminal fluid, Biochemical parameter, Sperm motility.