Research Article
www.aquaculturesciences.ir

مقاله پژوهشی
نشریه علوم آبزی پروری

مطالعه تغییرات شاخص‌های فیزیکی و بقا تخمک قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نگهداری شده در محیط‌های مختلف طی چند دوره زمانی

نسرین صائبی[۱]، سالار درافشان*[۱]، محمدرضا کلباسی[۲]

[۱]گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ۸۳۱۱۱-۸۴۱۵۶، ایران.
[۲]گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.
*نویسنده مسئول sdorafshan@iut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۱۷

چکیده

در این مطالعه نگهداری کوتاه‌مدت تخمک قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در محیط‌ها و دوره‌های زمانی مختلف بررسی شد. برای این منظور تخمک‌ها برای مدت زمان یک، چهار و هفت روز در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) و در محلول‌های مایع تخمدانی، کورتلند بافرشده با Hepes و کورتلند بافرشده Tris-HCl نگه‌داری شد؛ هر تیمار محلول-دوره زمانی در سه تکرار ۱۰ گرمی انجام شد. شاخص‌های مورد بررسی شامل وزن‌تر، وزن خشک، قطر تخمک، pH مایع نگه‌داری، درصد لقاح، درصد چشم‌زدگی و درصد تفریخ بود. نتایج نشان داد که طول دوره نگه‌داری تخمک اثر معنی‌داری بر وزن تر و خشک نداشته است اما بر قطر تخمک اثرگذار است و باعث افزایش آن می‌شود ($P<۰/۰۵$). میزان pH با افزایش مدت زمان نگه‌داری به‌طور معنی‌داری در همه محیط‌ها کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). بررسی درصد بقا تا چشم‌زدگی و تفریخ نشان داد که بیشترین بقا مربوط به تخمک نگه‌داری شده در محیط Hepes بود. از این‌رو می‌توان محیط بافری تولید شده با Hepes را به‌عنوان بهترین محیط مصنوعی برای نگهداری تخمک در قزل‌آلای رنگین‌کمان در کوتاه‌مدت معرفی کرد.

واژگان کلیدی: محیط مصنوعی نگه‌داری، محلول کورتلند، اووسیت ماهیان، نرخ لقاح، نرخ تفریخ.

مقدمه

به‌منظور تکثیر مصنوعی آزادماهیان، تخمک حاصل عموماً بلافاصله بعد از تخم‌کشی از ماهیان ماده، لقاح داده می‌شوند (Leitritz and Lewis, 1976). با این حال می‌توان به دلایلی از قبیل انتقال تخمک‌ها به مسافت دور (بیین مزارع)، راحتی نیروی کار در زمان تخم‌کشی و بهبود راندمان تخم‌کشی، عمل لقاح تخمک‌ها را به تأخیر انداخت (Quinn *et al*., 2002؛ Ginatullina *et al*., 2018). اما از آنجا که تخمک در زمان تخمک‌گذاری در ماهیان در مرحله دوم تقسیم میوز یعنی متافاز قرار دارند (Lubzens *et al*., 2010)، تأخیر در امر لقاح تخمک بعد از تخم‌کشی منجر به بروز پدیده پیری تخمک و در نهایت پدیده فوق‌رسیدگی آن خواهد شد. پیری تخمک با اعمال تغییرات عمده ریخت‌شناختی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، بافت‌شناختی، سلولی و مولکولی در درون تخمک یکی از متداول‌ترین عوامل اثرگذار بر کیفیت تخمک گزارش شده است (Rime *et al*., 2004; Samarin *et al*., 2016, 2017). این تغییرات کیفیت تخمک‌های رهاشده را به سرعت کاهش داده و در نهایت منجر به کاهش بازدهی لقاح-پذیری تخمک و در مراحل بعدی رشد تخم یعنی رشد جنین، تخم چشم‌زده، لارو تفریخ‌شده و نیز وقوع بدشکلی‌های زیاد در لاروهای حاصل خواهد شد (Aegerter *et al*., 2005; Samarin *et al*., 2016).

با وجود مطالعات گسترده نگه‌داری اسپرم به روش انجماد در بسیاری از ماهیان، کاربرد این روش

در تخمک ماهی تاکنون نتایج مطلوبی نداشته است (Lubzens *et al*., 2005; Bozkurt, 2019)، شکست در نگه‌داری تخمک با روش انجمادی به‌دلیل اندازه بزرگ تخمک، حجم زیاد آب آن، محتوای زرده و خصوصیات نفوذپذیری غشای آن گزارش شده است (Lubzens *et al*., 2005). بنابراین دستورالعمل‌های نگه‌داری کوتاه‌مدت تخمک با استفاده از محلول‌ها و دمای مناسب برای تخمک توسعه یافته‌اند (Bozkurt, 2019).

نگه‌داری کوتاه مدت تخمک با هدف افزایش طول عمر آن بعد از تخم‌کشی، بهبود مدیریت تفریخگاه، کاهش مشکلات ناشی از همخونی، انتقال تخمک بین کارگاه‌های تکثیر و نیز دستکاری‌های مجموعه کروموزومی مورد مطالعه قرار گرفته است (Samarin *et al*., 2017; Bozkurt, 2019). نگه‌داری کوتاه مدت تخمک آزادماهیان به صورت *In vitro* (خارج از بدن ماهی) عموماً به‌عنوان روش قابل انجام مدنظر می‌باشد (Samarin *et al*., 2017). مطالعات اولیه عمدتاً به بررسی کیفیت تخمک‌های انواع آزادماهیان نگه‌داری شده در شرایط دمایی مختلف پرداخته‌اند؛ Dahlberg و همکاران (۱۹۷۸)، با مطالعه روی قزل‌آلای سوکای (*Oncorhynchus nerka*) گزارش کردند که تأخیر ۲۰ دقیقه‌ای در لقاح تخمک‌ها اثر منفی بر آن‌ها نداشته است؛ اگرچه Leitritz و Lewis (۱۹۷۶)عنوان کردند که که با وجود تأخیر ۲۴ ساعت در لقاح، بقا حداکثری در تخمک‌ها دیده شده است. همچنین گزارش‌هایی از تأخیر ۸ تا ۲۰ ساعته در لقاح برای آزادماهی صورتی (*O. gorbuscha*) (Piper *et al*., 1982)، ۱۲ تا ۹۶ ساعته برای آزادماهی سوکای (*O. nerka*) (Piper *et al*., 1982) و ۳۶ تا ۱۲۴ برای آزادماهی چام (*O. keta*) (Jensen and Alderdice, 1984) بسته به دمای نگه‌داری گزارش شده است. اخیراً Bozkurt و همکاران (۲۰۱۰)،گزارشی از نگه‌داری تخمک کپور علف‌خوار در سه محلول رینگر، محلول گلوکز و مایع تخمدانی در دوره‌های زمانی مختلف بررسی کرده‌اند؛ همچنین Bozkurt (۲۰۱۹)، به مطالعه شاخص‌های کیفی تخمک نگه‌داری کپور معمولی در سه محلول مختلف Cognie، Kurokura و Zhang-Liu در دوره‌های زمانی مختلف ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه‌ای پرداخته است. به‌خوبی مشخص است که کمبود اطلاعات در مورد نگه‌داری *In vitro* تخمک‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در محیط‌های مصنوعی مختلف وجود دارد. بنابراین هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر ترکیبات مصنوعی مختلف و دوره زمانی روی ویژگی‌های لقاح‌پذیری و تفریخ تخمک‌های این ماهی تحت شرایط مختلف *In vitro* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه اسپرم و تخمک: مطالعه حاضر در سال ۱۳۹۷ با انتخاب مولدین نر و ماده و سپس استحصال تخمک و اسپرم در شرکت آبزی نگین شایان فریدونشهر واقع در شهرستان فریدون‌شهر استان اصفهان انجام شد. برای این کار از ۶ قطعه مولد نر با متوسط وزنی ۵۶±۱۷۰۰ گرم و ۶ قطعه مولد ماده با متوسط وزنی ۱۲۴±۳۴۰۰ گرم که از نظر سنی ۴ ساله و از نظر ظاهری سالم بودند، اسپرم‌گیری و تخم‌کشی با روش-های معمول و رایج انجام شد.

گروه‌های آزمایشی: گروه‌های آزمایشی شامل سه محیط نگهداری و نیز سه دوره زمانی نگهداری هستند. محیط‌های نگهداری مایع تخمدانی طبیعی و مایع تخمدانی مصنوعی یا محیط کورتلند با ترکیب پایه ۱۲۴/۱ میلی‌مول NaCl، ۵/۱ میلی‌مول KCl، ۱/۰ میلی‌مول $MgSO_4.7H_2O$، ۱/۶ میلی‌مول $CaCl_2.2H_2O$، ۵/۶ میلی‌مول گلوکز، pH برابر ۸/۵ بود (Niksirat et al., 2007). محیط کورتلند با ترکیب های جداگانه شامل بافرهای ۲۰ میلی‌مول Hepes ($C_8H_{18}N_2O_4S$) و ۲۰ میلی‌مول Tris-HCl ($C_4H_{11}NO_3$–HCl) بافر شده بود (Niksirat *et al*., 2007). از لیوان‌های یکبار مصرف برای نگهداری ۱۰ گرم تخمک همراه با ۱۵ میلی‌لیتر از محیط‌های نگهداری آماده شده یعنی یکی از سه محلول مایع

تخمدانی طبیعی، محلول کورتلند بافر شده با Hepes و محلول کورتلند بافر شده با Tris-HCl و برای تنظیم نور و تبادل اکسیژن از پوشش پارافیلمی به‌عنوان درپوش ظروف نگهداری تخمک‌ها استفاده شد (Niksirat *et al*., 2007). هر گروه از تخمک‌ها، در سه تیمار زمانی مختلف یک، چهار و هفت روز در محیط‌های مختلف ذکر شده نگهداری شدند.

لقاح و انکوباسیون تخم‌ها: بعد از طی شدن دوره زمانی مورد نظر برای هر تیمار (و تکرار)، تخمک‌ها با اسپرم تازه لقاح داده شدند. برای انجام عمل لقاح، ابتدا مایع نگهدارنده تخمک از آن‌ها جدا و سپس حدود ۲ میلی‌لیتر اسپرم به هر لیوان اضافه و با تخمک‌ها مخلوط شد؛ برای فعال کردن اسپرم‌ها و انجام فرایند لقاح، از آب سالن انکوباسیون استفاده شد. بعد از انجام عمل لقاح، شست‌وشوی تخم‌ها به‌منظور خارج کردن اسپرم‌های لقاح نیافته و مرده انجام و آبگیری تخم‌ها آغاز شد. تخم‌های لقاح‌یافته به تراف‌های کالیفرنیایی مجهز به سیستم مداربسته با دمای آب ۱۰ درجه سانتی‌گراد و اکسیژن حداقل ۷ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند.

سنجش شاخص‌ها:

الف) شاخص‌های فیزیکی: در کلیه تیمارها (محیط‌ها و دوره‌های زمانی نگهداری) و تکرارها، وزن تر هفت عدد تخمک و قطر آن‌ها با استفاده از کولیس دیجیتال (با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر) اندازه‌گیری و سپس وزن خشک آن‌ها بعد از ۲۴ ساعت قرارگیری در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد ثبت شد.

ب) سنجش pH: در همه تیمارها (محیط‌ها و دوره‌های زمانی نگهداری) و تکرارها، در پایان دوره زمانی نگهداری، مقدار pH محیط نگهداری تخمک با استفاده از دستگاه pH متر (Metrohm مدل ۷۴۴، ساخت کشور سوئیس) با دقت ۰/۰۱ واحد اندازه‌گیری شد.

ج) سنجش بقا: بعد از انجام لقاح تخمک‌های نگهداری شده در هر یک از محیط‌های نگهداری که دوره‌های زمانی مدنظر را طی کرده بودند، درصد لقاح با استفاده از روش اسید استیک اندازه‌گیری شد (Mabo, 2019). برای این منظور، از حدود روز دهم بعد از لقاح که کمان عصبی تشکیل می‌شود، ۳۰ عدد تخمک مربوط به هر تیمار (۱۰ عدد تخم از هر تکرار) برداشته و در اسید استیک رقیق قرار می‌گیرند. بعد از ۳۰ ثانیه، در تخم‌هایی که لقاح یافته‌اند کمربند سفیدرنگ مربوط به کمان عصبی ظاهر شد.

متوسط درصد لقاح:

۱۰۰× (تعداد کل تخم‌های لقاح داده شده/تعداد تخم دارای کمان عصبی) =درصد لقاح

درصد چشم‌زدگی:

۱۰۰× (تعداد کل تخم‌های لقاح داده شده/تعداد تخم‌های چشم‌زده) =درصد چشم‌زدگی

درصد تفریخ:

۱۰۰× (تعداد کل تخم‌های لقاح داده شده/تعداد تخم‌های تفریخ شده) =درصد تفریخ

تحلیل آماری: ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف بررسی شد و برای تعیین اختلاف بین تیمارهای آزمایشی از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) در هر یک از گروه‌های آزمایشی به‌صورت جداگانه استفاده شد و در صورت معنی‌دار بودن، مقایسه‌های چندگانه به کمک پس‌آزمون توکی صورت گرفت. به‌منظور بررسی وجود اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های روزهای یک و هفت (پس از تیماربندی و نگه‌داری تخمک) در هر تیمار از آزمون t-test استفاده شد. همچنین از آزمون فاکتوریل طرح GML جهت بررسی اثرات متقابل محیط و زمان نگه‌داری استفاده شد. آزمون‌ها در محیط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹و در سطح خطای ۰/۰۵ و ۰/۰۱ انجام گردید. همچنین برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های فیزیکی (وزن‌تر، وزن خشک و قطر

جدول ۱- اثر انفرادی و متقابل محیط و مدت زمان نگهداری تخمک بر هر یک از شاخص‌های فیزیکی تخمک قزل‌آلای رنگین‌کمان.

شاخص	وزن تر (g)	وزن خشک (g)	قطر (mm)
محیط نگهداری تخمک	۰/۰۰۱	۰/۱۰	۰/۰۰۸
مدت زمان نگهداری تخمک	۰/۰۹	۰/۰۰۷	۰/۰۰۰۱
محیط نگهداری تخمک × مدت زمان نگهداری تخمک	۰/۲۳	۰/۱۵	۰/۰۰۰

تخمک): نتایج تحلیل‌های آماری نشان داد که وزن تر تخمک‌ها تحت تأثیر محیط نگهداری و وزن خشک آن‌ها تحت تأثیر مدت زمان نگهداری تخمک قرار گرفته است و همچنین قطر تخمک تحت تأثیر محیط و مدت زمان نگهداری و اثر متقابل این دو قرار داشته است (جدول ۱).

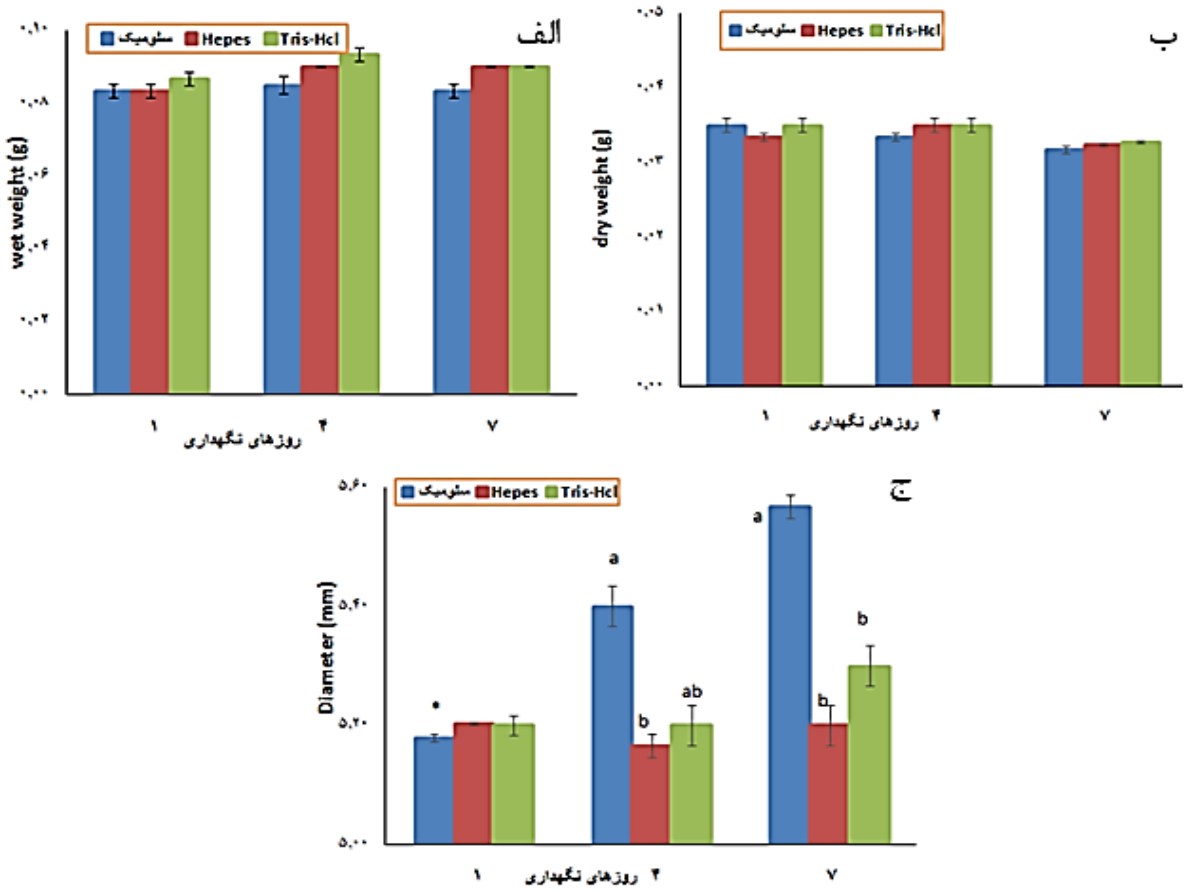
نتایج تحلیل‌های آماری ارائه شده در شکل ۱ (الف و ب)، تغییرات معنی‌داری در وزن تر و خشک تخمک در هیچ یک از تیمارهای محیط نگهداری در مدت زمان نگهداری مشابه، را نشان نداد ($P>۰/۰۵$)؛ همچنین اختلاف معنی‌داری در وزن تر و خشک تخمک در بین مدت زمان نگهداری متفاوت در تیمارهای محیط نگهداری یکسان مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). نتایج مربوط به قطر تخمک که در شکل (۱-ج) ارائه شده است که نشان‌دهنده روند افزایشی سریع در محیط مایع تخمدانی و روند افزایشی کند در محیط‌های Hepes و Tris-HCl است. دامنه قطر تخمک در تیمار سلومیک بین ۵/۱۶ تا ۵/۵۷ میلی‌متر، در محیط Hepes قطر تخمک از ۵/۱۶ تا ۵/۲۰ میلی‌متر و در محیط Tris-HCl از۵/۱۶ تا ۵/۳۰ میلی‌متر بود. نتایج نشان می‌دهند که تفاوت معنی‌داری در تیمار مایع تخمدانی (سلومیک) بین تخمک‌هایی که یک روز نگهداری شده بودند با تخمک‌هایی که چهار و هفت روز نگهداری شده‌اند، وجود داشت ($P<۰/۰۵$). همچنین در روز هفتم نگهداری، بین تیمار سلومیک با تیمار Hepes و Tris-HCl اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود ($P<۰/۰۵$).

pH محیط نگهداری تخمک ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان: بررسی نتایج pH محیط نگهداری تخمک در پایان هر دوره زمانی نگهداری ارائه شده در جدول ۲ نشان می‌دهد که محیط نگهداری تخمک و مدت زمان نگهداری آن تأثیر معنی‌داری بر میزان این شاخص داشته است ($P<۰/۰۵$). همچنین اثر متقابل محیط و مدت زمان نگهداری تخمک بر این شاخص معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$).

نتایج شکل ۲ نشان می‌دهد که در طول دوره نگهداری، pH کاهش یافته است. این کاهش در محیط سلومیک بیشتر است به‌طوری که اختلاف معنی‌داری در سه روز یک، چهار و هفت نگهداری مشاهده شد و تغییرات آن از ۸/۴ تا ۸/۰۴ گزارش شد. در محیط‌های Hepes و Tris-HCl روند به‌صورت کاهشی کند بود و اگرچه اختلاف معنی‌دار در روز هفت با روزهای یک و چهار مشاهده شد، با این وجود گستره تغییرات آن به‌ترتیب برابر ۸/۴۶ تا ۸/۴۹ و ۸/۲۷ تا ۸/۴۱ و بسیار محدود بود (شکل ۲). در روز اول، نگهداری محیط Hepes با محیط‌های سلومیک و Tris-HCl اختلاف معنی‌داری از لحاظ pH داشت. در روزهای چهار و هفت میان هر سه محیط اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۲).

شاخص‌های باروری و بقای تخمک با در طی نگهداری در محیط‌های مختلف: نتایج نشان داد که درصد لقاح و درصد چشم‌زدگی تحت تأثیر محیط نگهداری، مدت زمان نگهداری و اثر متقابل این دو قرارگرفته است ($P<۰/۰۵$). همچنین درصد تفریخ تحت تأثیر محیط و مدت زمان نگهداری تخمک قرارگرفته بود اما اثر متقابل این دو بر درصد تفریخ معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$).

بر اساس نتایج شکل ۳ الف، درصد لقاح در طی نگهداری تخمک در سه تیمار آزمایشی روند کاهشی داشته است. این روند در تیمار مایع تخمدانی طبیعی



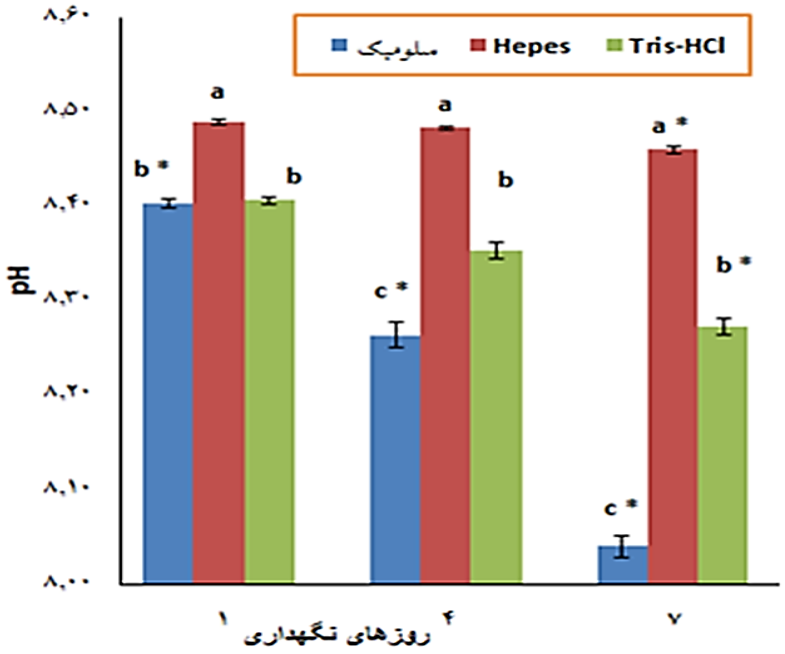
شکل ۱- نتایج مربوط به سنجش شاخص‌های فیزیکی در روزهای مختلف نگهداری تخمک (یک، چهار و هفت روز) الف: وزن تر (Wet weight) ب: وزن خشک (Dry weight) ج: قطر تخمک (Diameter) (حروف a، b و cبیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای محیط سلومیک، محیط کورتلند با بافر Hepes و محیط کورتلند با بافر Tris-HCl) در انتهای یک دوره یکسان نگهداری (روز) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد است (P<۰/۰۵)).

جدول ۲- اثر انفرادی و متقابل محیط و مدت زمان نگهداری تخمک بر pH محیط نگهداری تخمک قزل‌آلای رنگین‌کمان.

شاخص	pH
محیط نگهداری تخمک	۰/۰۰۰
مدت زمان نگهداری تخمک	۰/۰۰۹
محیط نگهداری تخمک× مدت زمان نگهداری تخمک	۰/۰۰۸

یا سلومیک شیب کاهشی سریع‌تری نسبت به تیمار Hepes و Tirs-HCl نشان می‌دهد. گستره درصد لقاح در تیمار سلومیک بین ۲۰ تا ۸۶/۶۷ درصد متغیر بود (شکل ۳). در این محیط نگهداری تفاوت معنی‌داری میان تخمک‌های یک روز نگهداری شده با تخمک‌های چهار و هفت روز نگهداری شده مشاهده شد. درصد لقاح در تیمار Hepes از ۹۰ درصد در روز اول تا ۵۳/۳۳ در روز هفتم متغیر بود. در این تیمار نیز تفاوت معنی‌داری میان تخمک‌های یک روز نگهداری با هفت روز نگهداری مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). همچنین درصد لقاح در تیمار Tris-HCl در گستره ۳۱/۶۷-۷۶/۶۷ قرار داشت ($P<۰/۰۵$). در این تیمار تفاوت معنی‌داری بین تخمک‌های یک روز نگهداری شده با سه و هفت روز مشاهده شد. در میزان درصد لقاح در تیمار روز یک و هفت میان تیمارهای Hepes و Tris-HCl و در روز چهارم میان تیمار سلومیک و Hepes اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$).

مطابق شکل ۳ ب، ج، درصد چشم‌زدگی و درصد

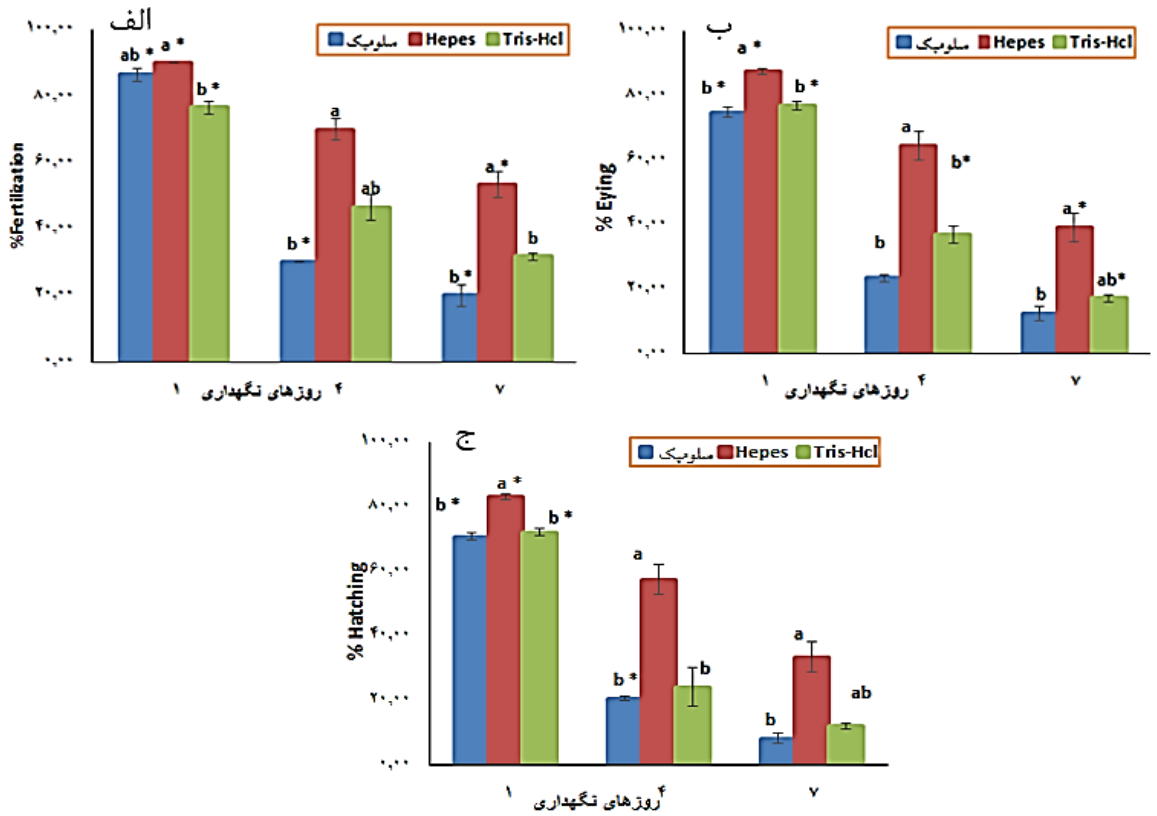


شکل ۲- تغییرات pH در روزهای مختلف نگهداری (یک، چهار و هفت) (حروف غیرهمسان بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در یک روز است. علامت * جهت نمایش وجود اختلاف معنی‌دار بین یک گروه در روزهای نگهداری متفاوت استفاده شده است (P<۰/۰۵)).

جدول ۳- اثر انفرادی و تلفیقی محیط و مدت‌زمان نگهداری تخمک بر هریک از شاخص‌های مربوط به بقا تخمک قزل‌آلای رنگین‌کمان.

شاخص	درصد لقاح	درصد چشم‌زدگی	درصد تفریخ
محیط نگهداری تخمک	۰/۰۱۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
مدت‌زمان نگهداری تخمک	۰/۰۰۰	۰/۰۰۸	۰/۰۰۷
محیط نگهداری تخمک × مدت‌زمان نگهداری تخمک	۰/۰۰۹	۰/۰۰۱	۰/۱۱

تفریخ در هر سه محیط نگهداری با گذشت زمان روند کاهشی داشته است که این روند در تیمار سلومیک شیب تندتری داشته است. درصد چشم‌زدگی در تیمار سلومیک از ۱۲/۶۷تا ۷۵ درصد و درصد تفریخ در این محیط نگهداری از۸/۳۳ تا ۷۳ متغیر بود. در این محیط نگهداری تفاوت معنی‌داری میان تخمک‌های یک روز نگهداری شده با تخمک‌های چهار و هفت روز نگهداری شده از لحاظ درصد چشم‌زدگی و تفریخ مشاهده شد. درصد چشم‌زدگی در تیمار Hepes از ۳۹/۳۳ تا ۸۷/۶۷ و درصد تفریخ از ۳۳/۶۷ تا ۸۳/۳۳ متغیر بود. در این تیمار درصد چشم‌زدگی و تفریخ نیز تفاوت معنی‌داری میان تخمک‌های یک روز نگهداری با هفت روز نگهداری داشتند. درصد چشم‌زدگی در محیط Tris-HCl از ۱۷/۳۳ تا ۷۷ و درصد تفریخ از ۱۲ تا ۷۲/۳۳ متغیر بود. در این محیط بین همه روزهای نگهداری اختلاف معنی‌داری از لحاظ چشم‌زدگی و تفریخ وجود داشت. در تخمک‌هایی که یک روز نگهداری شده بودند بین تیمار Hepes با تیمار سلومیک و Tris-HCl از لحاظ درصد چشم‌زدگی و تفریخ اختلاف معنی‌داری وجود داشت. درصد چشم‌زدگی در تخمک‌هایی چهار روز نگهداری شده بودند بین تیمار Hepes با تیمارهای سلومیک و Tris-HCl اختلاف معنی‌داری داشتند. درصد چشم‌زدگی و تفریخ در تخمک‌های هفت روز نگهداری شده بین تیمار سلومیک و Hepes اخلاف معنی‌داری را نشان داد. با توجه به نتایج ارائه شده در تیمار Hepes روند کاهشی درصد بقا کمتر بوده و همچنین نسبت به دو محیط دیگر درصد بقا در روز یکسان بیشتر بوده است.



شکل ۳- نتایج مربوط شاخص‌های بقا در روزهای مختلف نگهداری تخمک (یک، چهار و هفت روز) الف: درصد لقاح ب: درصد چشم‌زدگی ج: درصد تفریخ (حروف غیرهمسان بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها (تیمار ۱: محیط سلومیک، تیمار ۲: محیط کورتلند با بافر Hepes و تیمار ۳: محیط کورتلند با بافر Tris-HCl) در یک روز است. علامت * وجود اختلاف معنی‌دار بین یک گروه در روزهای نگهداری متفاوت استفاده شده است ($P<۰/۰۵$)).

بحث

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات محلول‌های مختلف نگهداری تخمک شامل مایع تخمدانی، محلول کورتلند با بافر Hepes و محلول کورتلند با بافر Tris-HCl در دوره‌های زمانی نگهداری مختلف شامل ۱، ۴ و ۷ روز بر شاخص‌های فیزیکی تخمک از قبیل وزن تر، وزن خشک، قطر تخمک، pH مایع نگهداری و نیز بر شاخص‌های بقا تخمک از قبیل درصد لقاح، درصد چشم‌زدگی و درصد تفریخ در تخمک ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود.

نتایج بررسی تغییرات قطر تخمک ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در محلول‌های مختلف و دوره‌های زمانی مختلف نشان داد که قطر تخمک در محیط نگهداری مایع سلومیک افزایش بیشتری نسبت به دو محیط نگهداری دیگر داشته است؛ از آنجا که افزایش قطر تخمک ناشی از جذب آب محیط نگهداری بوده که این می‌تواند منجر به وقوع سریع‌تر و بیشتر پدیده فوق‌رسیدگی در تخمک‌ها شود، در نتیجه احتمالاً فوق‌رسیدگی بیشتری در این محیط رخ می‌دهد (Samarin *et al.*, 2017) که این امر می‌تواند بر شاخص‌های بقا یعنی سه شاخص درصد لقاح، درصد چشم‌زدگی و درصد تفریخ نیز به‌صورت منفی تأثیرگذار باشد (Samarin *et al.*, 2016)؛ در ادامه بررسی نتایج مطالعه حاضر می‌توان بیان کرد که درصد لقاح، درصد چشم‌زدگی و نیز درصد تفریخ تخم‌های حاصل از تخمک‌های نگهداری شده در مایع سلومیک به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) کمتر از تخمک‌های نگهداری شده در محیط‌های کورتلند با بافر Hepes و کورتلند با بافر Tris-HCl در هر سه دوره زمانی نگهداری یک، چهار و هفت روز بود؛

همچنین هر سه شاخص درصد لقاح، درصد چشم‌زدگی و درصد تفریخ تخم‌ها با افزایش طول دوره نگهداری تخمک‌ها در هر سه محیط سلومیک، کورتلند با بافر Hepes و کورتلند با بافر Tris-HCl روند کاهشی را نشان می‌دهند. به‌نظر می‌رسد مدت زمان نگهداری تخمک و نیز نوع محیط نگهدارنده می‌توانند بر بقای تخمک اثرگذار باشند. به‌طوری‌که با افزایش زمان نگهداری بقای تخمک کاهش خواهد یافت و همچنین در محیطی که تخمک در آن زودتر دچار پدیده فوق‌رسیدگی شود میزان بقا کاهش می‌یابد.

Azuma و همکاران (۲۰۰۳) با بررسی شاخص های بقا تخم حاصل از تخمک آزاد ماهی ماسو (*Oncorhynchus masu*) نگهداری شده در محیط‌های مایع سلومیک طبیعی و مایع سلومیک مصنوعی، بیان داشتند که درصد لقاح تخمک‌های نگهداری شده به مدت دو هفته در مایع سلومیک طبیعی بیشتر از درصد لقاح تخمک‌های نگهداری شده در مایع سلومیک مصنوعی (با ترکیب ۱۵۲/۶ میلی‌مول NaCl، ۳/۵ میلی‌مول KCl، ۲/۳ میلی‌مول $CaCl_2$، ۷/۰ میلی‌مول $MgCl_2$ و ۵/۰ میلی‌مول $NaHCO_3$ با pH برابر با ۸/۲ که مشابه ترکیب یونی مایع سلومیک ماهی آزاد ماسو) بود. این محققان مقدار نرخ تفریخ تخم‌های آزادماهی ماسو حاصل از تخمک‌های نگهداری شده به مدت ۱۴ روز در مایع سلومیک طبیعی را ۳۶ درصد گزارش داده‌اند، این در حالی بود که مقدار این شاخص برای تخم‌های نگهداری شده در مایع سلومیک مصنوعی، بعد از ۴ (چهار) روز به ۱ درصد رسیده است (Azuma *et al.*, 2003). به‌نظر می‌رسد مدت زمان نگهداری تخمک و نیز نوع محیط نگهدارنده می‌توانند بر بقای تخمک اثرگذار باشند. به‌طوری‌که با افزایش زمان نگهداری بقای تخمک کاهش خواهد یافت و همچنین در محیطی که تخمک در آن زودتر دچار پدیده فوق‌رسیدگی شود میزان بقا کاهش می‌یابد. Azuma و همکاران (۲۰۰۳) دلیل بالاتر بودن درصد لقاح و تفریخ تخم های حاصل از تخمک‌های نگهداری شده در محیط سلومیک طبیعی را به ترکیبات شناخته شده و ناشناخته موجود در آن محلول نسبت داده‌اند. آن‌ها همچنین در توضیح دلیل کاهش درصدهای لقاح و تفریخ با افزایش طول دوره نگهداری تخمک به بررسی میکروسکوپی قطر تخمک، ساختارهای بلاستومر، قطرات چربی پرداختند و عنوان کردند که با افزایش طول دوره نگهداری فارغ از نوع محیط نگهداری کاهش در تعداد بلاستومرها، تأخیر در فرایند کلیواژ و نیز تغییرات در ذخایر چربی دیده شده است. افزایش طول دوره نگهداری تخمک منجر به وقوع پدیده پیری و فوق‌رسیدگی تخمک خواهد شد. وقوع پدیده پیری همان‌طور که قبلاً به آن اشاره شده است منجر به کاهش کیفیت تخمک شده که به‌صورت کاهش درصد لقاح، کاهش بازدهی رشد جنین، تخم چشم‌زده، لارو تفریخ شده و نیز وقوع تولد آلوین‌های ضعیف و بدشکلی های زیاد در لاروهای حاصل خواهد شد (Aegerter *et al.*, 2005; Samarin *et al.*, 2016).

بررسی تغییرات شاخص pH نشان داد که این شاخص در مایع تخمدانی کاهش بیشتری را نشان داد؛ این کاهش احتمالاً به‌دلیل عدم وجود بافر در مایه تخمدانی بوده باشد؛ با افزایش طول دوره نگهداری تخمک در محیط‌های مختلف، فرایندهای تنفس سلولی، اعمال تغییرات در ساختاری لیپیدی تخمک و آزاد شدن اسیدهای چرب غشای تخمک رخ می‌دهند، برآیند این فعل و انفعالات سلولی منجر به کاهش مقدار شاخص pH در تخمک‌های می‌شود که در نهایت کاهش در نرخ‌های لقاح، چشم‌زدگی و تفریخ تخم بروز خواهند کرد؛ همان‌طور که مشاهده شد، مقادیر شاخص‌های بازماندگی، لقاح، چشم‌زدگی و تفریخ، در تخم‌های حاصل از تخمک‌های نگهداری شده در مایع سلومیک با افزایش دوره نگهداری تخمک، کاهش بیشتری نسبت به تخمک‌های نگه داری داری شده در دو محیط دیگر داشتند.

مقدار شاخص pH محیط مصنوعی نیز در مطالعه

Niksirat و همکاران (۲۰۰۷) به آرامی با گذشت زمان نگهداری تخمک کاهش یافته است. مشابه با نتایج این مطالعه، در مطالعه Niksirat و همکاران (۲۰۰۷) نیز، ارتباط مثبت بین مقادیر pH و نرخ‌های لقاح، چشم‌زدگی و تفریخ تخم ها وجود داشت. بنابراین، می‌توان بیان کرد که کاهش pH به‌عنوان یک فاکتور محدودکننده زنده‌مانی تخم‌ها در طول نگهداری در محیط‌های مصنوعی مورد توجه قرار می‌گیرد؛ اما، برای حداقل یک دوره نگهداری ۴۸ ساعته، تغییرات اندک و آهسته در مقدار pH نمی توانست عامل کاهش معنی‌دار در لقاح تخمک‌های نگهداری شده باشد.

Niksirat و همکاران (۲۰۰۷) بعد از بررسی تغییرات تخمک قزل‌آلای خال قرمز دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) نگهداری شده به مدت ۱۲۰ ساعت در محلول‌های مایع سلومیک، و کورتلند بافر شده (سه محلول کورتلند: بافر شده با Hepes، بافر شده به Tris-HCl و بافر شده با Hepes نمک سدیم) گزارش دادند که طول دوره زمانی اثر منفی معنی‌داری بر شاخص‌های چشم‌زدگی، تفریخ و نرخ مرگ‌ومیر تخم‌های چشم‌زده حاصل از تخمک‌های نگهداری شده در محیط‌های مختلف دارد.

کاهش نرخ لقاح و افزایش نرخ مرگ‌ومیر تخم چشم‌زده در تخم‌های حاصل از تخمک‌های نگهداری شده از دو جنبه قابل بحث است: ۱) طول دوره نگهداری، ۲) نوع محیط نگهداری. محیط رینگر، محلول گلوکز و مایع تخمدانی قادر به افزایش طول مدت نگهداری تخمک کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) در دمای ۴ درجه بودند (Bozkurt *et al*., 2010). در مطالعه Bozkurt و همکاران (۲۰۱۰)، بیشترین نرخ لقاح در تخمک‌های نگهداری شده در محلول گلوکز ۳۰۰ میلی‌مولار دیده شد. بنابراین، این طور نتیجه‌گیری شده است که امکان افزایش قابلیت لقاح تخمک ماهیان با استفاده از محیط محرک مناسب که طول دوره تحرک را افزایش دهد، وجود دارد (Bozkurt *et al*., 2010).

با وجود نگهداری موفق تخم در مایع تخمدانی در برخی مطالعات (Niksirat et al., 2007; Hugunin *et al*., 2008; Bozkurt *et al*., 2010; Bozkurt and Yavaş, 2012; Samarin *et al*., 2016; Samarin *et al*., 2017) آلودگی با مواد ناخواسته از قبیل خون، ادرار، مدفوع و زرده حاصل از تخمک‌های پاره شده که اغلب در طول تخم‌کشی با مایع تخمدانی مخلوط می‌شوند، در موفقیت در لقاح دخالت دارند (Wilcox *et al*., 1984; Van Heerden *et al*., 1996). این آلاینده‌ها ممکن است قابلیت ذخیره‌سازی مایع تخمدانی به‌عنوان محیط نگهدارنده را با محدودیت مواجه کند. علاوه بر نوع محیط نگهداری تخمک، دمای نگهداری و نیز سرعت تغییرات دمایی برای رسیدن به دمای مناسب در طول دوره نگهداری و دمای مناسب برای لقاح به دلیل اثرات شوک دمایی، نیز می‌تواند اثر مهمی بر ثبات کیفیت داشته باشد (Bozkurt, 2019).

Bozkurt (۲۰۱۹) در مطالعه نگهداری تخمک کپور معمولی نژاد کوی (*Cyprinus carpio*) در محلول‌های Cognie، Kurokura و Zhang-Liu و مایع تخمدانی بیان داشت که می‌توان تخمک این ماهی را برای مدت ۱۸۰ دقیقه در دمای ۲۰ در شرایط *In vitro* درجه نگهداری کرد اگرچه محلول Cognie تخمک‌های را در شرایط مطلوب‌تری نگهداری کرده است.

مطالعات مختلف گزارش داده‌اند که تخمک‌های رسیده را می‌توان برای چند روز در مایع تخمدانی نگهداری کرد و طول دوره نگهداری با دمایی نگهداری ارتباط دارد (Bozkurt and Yavaş, 2012; Samarin *et al*., 2017; Ginatullina *et al*., 2018). باید در نظر داشت که موفقیت کلی حفاظت به شدت به ترکیب نگهدارنده، منشأ مولد و تخمک بستگی دارد. علاوه بر این، حفظ (preservation) فعالیت متابولیکی و بقای تخمک‌ها ممکن است با سلامت مولد، زمان رهاسازی تخمک (اوولاسیون) دما

نگهداری تخمک و نیز کیفیت آب تفریخگاه ارتباط داشته باشد (Linhart and Billard, 1995).

مطالعه Goetz و Coffman (۲۰۰۰) نشان دادند که بعد از نگهداری تخمک قزل‌آلای رنگین‌کمان به مدت ۴۸ ساعت در سه محیط مایع سلومیک ماهی، محلول کورتلند با بافر Hepes و محلول کورتلند با بافر Tris-HCl، بقای تخمک‌های نگهداری شده در محلول کورتلند با بافر Hepes بیشتر از دو محیط دیگر است که نتایج مشابهی نیز در مطالعه حاضر بدست آمده است. در نهایت این‌گونه به نظر می‌رسد که بروز تغییرات در قطر تخمک که احتمالاً نشان دهنده تخریب دیواره و جذب آب توسط فضای پیرازرده‌ای است در محیط مایع سلومیک طبیعی با شدت بیشتری رخ داده اما در محیط‌های مصنوعی بافر شده با Hepes و Tris-HCl به‌دلیل مقاومت بیشتر در مقابل تغییرات pH ناشی از تنفس سلولی، این تغییرات کمتر و لذا بقای تخمک بالاتر است. در تحقیقات آتی، بررسی تأثیر زمان و محیط مصنوعی بر فلور میکروبی و برخی تغییرات آنتی‌اکسیدانی تخمک نیز پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسلیه لازم است که از مدیریت و کارشناسان شرکت آبزی نگین شایان فریدونشهر خصوصاً جناب آقای دانشمندی و آقای مهندس مؤمنی در تأمین بخشی از هزینه‌های اجرای تحقیق و نیز تأمین گامت‌های نر و ماده ماهی جهت اجرای آزمایش، سپاسگزاری نماییم.

منابع

Aegerter S., Jalabert B., Bobe J. 2005. Large scale real-time PCR analysis of mRNA abundance in rainbow trout eggs in relationship with egg quality and postovulatory ageing. *Molecular Reproduction and Development* 72, 377-385.

Azuma T., Ohta H., Oda S., Muto K., Yada T., Unuma T. 2003. Changes in Fertility of rainbow trout eggs retained in coelom. *Fisheries Science* 69, 131-136.

Bozkurt Y., Yavaş İ. 2012. Effect of temperatures and storage periods on fertilizing capacity of short-term preserved scaly carp (*Cyprinus carpio*) eggs. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 64, 680-685.

Bozkurt Y. 2019. Hatching Success of Koi Carp (*Cyprinus carpio*) Embryos Following Short-Term Storage of Unfertilized Eggs. *Acta Aquatica Turcica* 15(4), 481-486.

Bozkurt Y., Öğretmen F., Secer F.S. 2010. Short-Term Preservation of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Eggs: Effect of Extenders and Storage Duration. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 62(3), 189-194.

Dahlberg M.L., Bailey J.E., Pinette W.S. 1978. Evaluation of three methods of handling gametes of sockeye salmon for transport to incubation facilities. *Progressive Fish-Culturist* 40, 71-72.

Ginatullina E., Komrakova M., Holtz W. 2018. Chilled storage of unfertilized and fertilized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs in sealed polyethylene bags at different temperatures. *Aquaculture* 484, 214-218.

Ginatullina E., Komrakova M., Holtz W. 2018. Chilled storage of unfertilized and fertilized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs in sealed polyethylene bags at different temperatures. *Aquaculture* 484, 214-218.

Goetz F.W., Coffman M.A. 2000. Storage of unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in artificial media. *Aquaculture* 184, 267-276.

Hugunin H.A., Parsons J.M., Naglar J.J. 2008. The influence of coelomic fluid on in vitro fertilization success in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 281, 155-157.

Jensen J., Alderdice D. 1984. Effect of temperature on short-term storage of eggs and sperm of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Aquaculture* 37, 251-265.

Linhart O., Billard R. 1995. Biology of

gametes and artificial reproduction in common tench (*Tinca tinca* L.). A review. *Polskie Archivum Hydrobiologii* 42, 37-56.

Lubzens E., Young G., Bobe J., Cerda J. 2010. Oogenesis in teleosts: how fishe ggs are formed. *General and Comparative Endocrinology* 165, 367-389.

Lubzens Z., Rosenfeld H., Meiri I., Olsson P.E., Cerda G., Babin P.J., Admon A., Carnervali O., Rawson D., Zhang T., Dichtl M., Pagelson G. 2005. Cryopreservation of fish oocytes: achievements and prospects. In: van Stappen H, Sorgeloos W (Eds.). Larvi 05-Fish & Shellfish larviculture Symposium, European Aquaculture Society, Special Publication 36, 296-297.

Mabo L. 2019. Effect of variant ovarian fluid on sperm performance and egg fertilization rates of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). Department of Wildlife, Fish, and Environmental Studies, Swedish University of Agricultural Sciences. 29 p.

Piper R.G., McElwain I.B., Orme L.E., McCraren J.P., Fowler L.G., Leonard J.R. 1982. Fish hatchery management. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, D.C.

Quinn T.P., Peterson J.A., Gallucci V.F., Hershberger W.K., Brannon, E.L. 2002. Artificial selection and environmental change: countervailing factors affecting the timing of spawning by coho and Chinook salmon. *Transactions of the American Fisheries Society* 131, 591-598.

Rime H., Guitton N., Pineau C., Bonnet E., Bobe J., Jalabert B. 2004. Post-ovulatory ageing and egg quality: a proteomic analysis of rainbow trout coelomic fluid. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2, 26-36.

Samarin A.M., Blecha M., Uzhytchak M., Bytyutskyy D., Żarski D., Flajshans M., Policar T. 2016. Post-ovulatory and post-stripping oocyte ageing in northern pike, *Esox lucius* (Linnaeus, 1758), and its effect on egg viability rates and the occurrence of larval malformations and ploidy anomalies. *Aquaculture* 450,431-438.

Samarin A.M., Policar T., Lahnsteiner F. 2015. Fish oocyte ageing and its effect on egg quality. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 23, 302-314.

Samarin A.M., Żarski D., Palińska-Żarska K., Krejszeff S., Blecha M., Kucharczyk D., Policar T. 2017. In vitro storage of unfertilized eggs of the Eurasian perchand its effect on egg viability rates and the occurrence oflarval malformations. *Animal* 11(1), 78-83

Van Heerden E., Van Vuren J.H.J., Steyn G.J. 1996. Effect of excreta, blood and vitellus contamination on fertilisation success of *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 141, 173-182.

Wilcox K.W., Stoss J., Donaldson E.M. 1984. Broken eggs as a cause of infertility of coho salmon gametes. *Aquaculture* 40, 77-87.

Yamazaki F., Goodier J., Yamano K. 1989. Choromosomal aberrations caused by aging and hybridization in charr, masu salmon and related salmonids. *Physiological, Ecological Journal of Species* 1, 529-542.

Physical indices changes and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs kept in different environments for different time duration

Nasrin Saebi[1], Salar Dorafshan[*1], Mohammad Reza Kalbassi[2]

[1]Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156-83111, Iran.
[2]Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.
*Corresponding author: sdorafshan@.iut.ac.ir

Received: 2022/3/1 Accepted: 2022/11/8

Abstract

In this study, short-term storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs in different environments and time periods was investigated. For this purpose, fish eggs were stored for one, four and seven days at refrigerator temperature (4°C) and in the natural ovarian fluid, Cortland buffered with Hepes and Tris-HCl, at pH=8.4. The individual egg wet and dry weights, egg diameter, storage fluid pH, fertilization, eyed and hatching percentage were measured. The results showed that egg storage time did not change wet and dry weights significantly, while egg diameter were increased significantly ($P<0.05$). The pH level decreased significantly with increasing storage time in all environments ($P<0.05$) although the highest decrease were observed in ovarian fluid, Survival rates including fertilization, eyed and hatching rates were measured and indicated that the highest survival rates were obtained for eggs stored in Hepes environment. So, the artificial medium buffered with Hepes could be recommended for short-term storage of rainbow trout eggs.

Keywords: Artificial storage medium, Cortland solution, Fish oocyte, Fertilization rate, Hatching rate.