تاثیر محلول های رقیق کننده اسپرم بر شاخص های اسپرم شناختی و عملکرد لقاح درماهی سفیدک سیستان *(Schizothorax zarudnyi)*

احمد قرایی[1*]، عباس علیزاده سرگزی[2]، مصطفی غفاری[3]، جواد میردار هریجانی[4]

۱. گروه شیلات، پژوهشکده تالاب بین المللی هامون و دانشکده منابع طبیعی دانشگاه زابل، ایران

۲. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه زابل، ایران

۳. گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی چابهار، ایران

۴. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

*نویسنده مسئول: agharaei551@uoz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۸

چکیده

در این تحقیق تاثیر رقیق کننده ها ی اسپرم بر عملکرد تکثیر به منظور افزایش درصد لقاح، چشم زدگی و تخم گشایی بررسی شد. به این منظور تعداد ۸ عدد مولد ماده به ترتیب با میانگین وزنی و طولی ۲۹۵/۴۳±۱۵۴۵/۶۲ گرم و ۳/۸۵±۵۴/۳۷ سانتیمتر و۱۶ عدد ماهی مولد نر به ترتیب با میانگین وزنی و طولی ۱۸۰/۶۹±۶۲۳/۰۸ گرم و ۵/۴۰±۳۸/۹۱ سانتیمتر، انتخاب گردیدند. پس از جداسازی مایع تخمدانی مخلوط اسپرم ها و تخمک ها با استفاده از چهار نوع محلول رقیق کننده اسپرم لقاح داده شدند.گروه های تیماری شامل:اول- ۵/۵۴ گرم NaCl،۲/۴۲۲ گرم Triss، ۳/۵۷گرم Glycin که در pH= ۸/۴ تنظیم که در یک لیتر آب مقطر بطور کامل حل شد.دوم- ۷/۳۰۵گرم NaCl، ۰/۷۳۵ گرم $CaCl_2.2H2O$ که در pH=۷/۷۶ تنظیم و در یک لیتر آب مقطر بطور کامل حل شد. سوم- مایع تخمدانی که فقط به وسیله توری از تخمک جدا شد و چهارم - آب مقطر که بعنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. ضمن تعیین حجم اسپرم، pH، تراکم اسپرماتوکریت مخلوط اسپرم ها، پارامترهای اسپرم شناختی از قبیل مدت دوره ی تحرک، مدت زمان حرکت رو به جلو، درصد اسپرم های متحرک، و همچنین درصد چشم گشایی در تیمار بررسی گردید. نتایج نشان داد که طول دوره ی تحرک در تیمارهای اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب ۷/۳۶±۸۳/۲۵، ۱۲/۶۵±۱۱۷/۸۰، ۲/۳۰±۶۱/۳۳، ۱/۷۳±۴۰/۰۰ ثانیه و مدت حرکت رو به جلو در تیمار اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب ۴/۷۱±۶۳/۲۵، ۱۲/۶۳±۹۰/۰۰، ۱/۱۵±۵۲/۳۳ و۲/۵۱±۳۴/۶۶ ثانیه و درصد تحرک در تیمارهای اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب ۶/۴۲±۶۶/۸۲، ۴/۱۶±۸۴/۰۰، ۳/۵۳±۸۲/۵۰ و ۲/۰۸±۷۳/۳۳ و درصد چشم زدگی در تیمار اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب ۷/۱۴±۶۱/۶۶، ۰/۹۷±۷۷/۲۵، ۶/۱۸±۵۵/۶۳ و ۵/۰۲±۴۲/۵۹ و درصد تخم گشایی در تیمار اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب ۵/۴۲±۵۵/۰۵، ۰/۸۱±۷۱/۴۳، ۶/۲۵±۴۹/۶۰ و ۴/۳۲±۳۷/۷۲ بودند. تجزیه و تحلیل پارامترهای اسپرم شناختی ودر صد چشم زدگی وتخم گشایی نشان داد که بین تیمار دوم با سایر تیمارها اختلاف معنی داری وجود دارد ($p<0/05$) و تیمار دوم می تواند به عنوان یک رقیق کننده مناسب جهت بهبود تکثیر ماهی شیزوتراکس زارودنی استفاده شود.

واژگان کلیدی: شیزوتراکس زارودنی، ماهی سفیدک سیستان، رقیق کننده اسپرم، سیستان.

مقدمه

ماهی شیزوتوراکس زارودنی (*Schizothorax zarudnyi*) متعلق به خانواده کپور ماهیان و یکی از با ارزش ترین گونه‌های اقتصادی بومی سیستم‌های آبهای جریان‌دار رودخانه‌ای، آبهای ساکن، تالابهای سه‌گانه هامون و چاه‌نیمه‌های سیستان است (ذبیحی و همکاران، ۱۳۸۲). به دنبال خشکسالی‌های متوالی در منطقه سیستان و خشک شدن تالاب هامون و در

نتیجه از بین رفتن زیستگاه و زمینه تکثیر طبیعی این ماهی و ورود گونه‌های غیربومی احتمال خطر انقراض نسل آن بوجود آمده است (Gharaei *et al.*, 2011).

کیفیت اسپرم تحت تاثیر شاخص هایی از قبیل طول دوره تحرک، حرکت رو به جلو، میزان اسپرماتوکریت، غلظت اسپرم، محتوای ATP، میزان یون های موجود در پلاسمای منی و همچنین رقیق کننده ها و ترکیبات پلاسما قرار دارد. شایان ذکر است که لقاح خود متاثر از کیفیت اسپرم بوده و می توان آن را عامل موثر بر باروری تخمک ها تلقی کرد. معمولا کیفیت اسپرم با شدت تحرک بر پایه سلول های متحرک و مدت زمان تحرک رو به جلو در اسپرم مرتبط است. با تغییر عواملی نظیر pH، فشار اسمزی، غلظت هر یک یا ترکیبی از کاتیون ها و افزایش ATP می توان سبب افزایش تحرک اسپرم شد (لرستانی و همکاران، ۱۳۸۷).

اسپرماتوزوای ماهی به همراه مایع اسپرمی، منی را تشکیل می دهد. مایع اسپرمی ترکیبی منحصر به فرد است. بعضی از ترکیبات آن نقش حفاظتی و نگهدارند گی اسپرم را بر عهده دا شته و برخی دیگر بر عملکرد روند های تولید مثل و نیز عملکرد اسپرماتوزوا نقش تاثیر دارند Ciereszko *et al.*, (2000). مطالعه ویژه گی های اسپرم برای درک فرآیند های بیوشیمیایی تحرک اسپرم و لقاح ضروری است. به دین وسیله می توان توانایی های تولید مثلی گونه های مختلف ماهیان ارزیابی کرد. مایع اسپرمی ماهیان حاوی عناصر غیر آلی از قبیل یون های سدیم، پتاسیم، کلسیم، کلراید و منیزیم است که در جلوگیری از تحرک و یا فعال سازی تحرک اسپرم نقش دا شته و نیز عناصر آلی مانند گلوکز، تری گلیسرید ها و اسیدهای چرب که نقش اصلی در متابولیسم انرژی دارند(Lahnsteiner *et al.*, 1998; Babiak *et al.*, 2001).

تحرک اسپرماتوزوا نقش مهمی در موفقیت عملیات لقاح مصنوعی ایفاء کرده و به عنوان یکی از فاکتورهای مهم ارزیابی کیفی اسپرم مطرح است (Lahnsteiner *et al.*, 1996). زیرا مدت زمان تحرک اسپرم همان زمان در دسترس بودن اسپرم برای لقاح است. داشتن دانش کافی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی اسپرم نه تنها در فهمیدن پاسخ ماهی در شرایط اسارت اهمیت دارد، بلکه گامی اساسی برای بهینه‌سازی روش های باروری است که در تحقیقات بیوتکنولوژی از قبیل ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت، انجماد و ایجاد حیوانات تراریخته نیز به کار می رود. به همین منظور می‌بایست زیست نشانگر ها ی کیفی و کمی اسپرم (اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، طول دوره تحرک اسپرم، درصد تحرک اسپرماتوزوا) که مستقیماً روی توانایی لقاح اسپرم موثرند، مشخص شوند (Rurangwa *et al.*, 2004). هدف از این مطالعه بررسی تاثیر محلول های رقیق کننده مختلف بر پارامترهای اسپرم شناختی (اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، طول دوره تحرک اسپرم، درصد تحرک اسپرماتوزوا، pH) در مولدین نر ماهی شیزوتوراکس زارودنی و عملکرد لقاح (درصد چشم زدگی و درصد تخم گشایی) است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در سال ۱۳۹۰، در مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهی بومی زهک (زهک، سیستان و بلوچستان) و در فصل تکثیر مصنوعی ماهی شیزوتوراکس از اوایل اسفند ماه آغاز و تا اوایل فروردین ماه انچام شد . در این تحقیق از تعداد ۸ ماهی مولد ماده با متوسط طول کل ۳/۸۵± ۵۴/۳۷ سانتیمتر و وزن متوسط ۲۹۵/۴۳± ۱۵۴۵/۶۲ گرم و

تعداد ۱۶ ماهی مولد نر با متوسط طول کل۵/۴۰± ۳۸/۹۱ سانتیمتر و متوسط وزن ۱۸۰/۶۹± ۶۲۳/۰۸ گرم استفاده گردید. بعد از بیهوشی مولدهای با پودر گل میخک، علامتگذاری، وزن کشی و اندازه گیری طول ماهیان ، تزریق هورمون مولد مورد نظر انجام شد. تزریق داخل عضلانی هورمون اواپریم به مولدهای ماده به ترتیب به میزان ۰/۲، ۰/۵، ۰/۵ و ۰/۳ میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهی صورت گرفت. فواصل تزریق اول و دوم و سوم ۲۴ ساعت و مرحله سوم و چهارم ۱۲ ساعت بود و میزان تزریق هورمون برای تمام مولدهای نر ۰/۳ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهی و همزمان با مرحله دوم تزریق ماهیان ماده بود (Gharaei *et al.*, 2011). سپس مولدها به وانی که به خوبی هوادهی می شد، منتقل شدند تا کاملاً به هوش آمده و سر حال گردند.

مولدهای نر و ماده که قبل از تزریق جدا از هم در حوضچه های مستطیلی نگهداری می شدند، بعد از تزریق به صورت توام در حوضچه گرد جریان‌دار قرار گرفتند. کنترل مولدهای در هنگام تزریق در هر مرحله انجام شد و بعد از تزریق دوم، فواصل بررسی کاهش داده شد و هر ۱۲ساعت انجام گرفت. مولدهایی که به مرحله اوولاسیون رسیده بودند، بیهوش و تخم کشی شدند.از مولدهای نر به آرامی اسپرم بدون خونابه و آلودگی در داخل بشر گرفته شد و حجم آن اندازه گیری گردید. برای یکسان شدن شرایط تکثیر تمام تخمک های استحصال شده از مولدهای ماده با هم مخلوط شدند. به دلیل احتمال عقیم بودن یا کیفیت نامناسب اسپرم در بعضی از مولدها، یا کیفیت بالای اسپرم در برخی دیگر، اسپرم های چندین مولد نر با هم مخلوط می شدند. این تحقیق در ۴ تیمار و ۴ تکرار به ازای هر تیمار انجام شد. سپس به منظور انجام عملیات لقاح از چهار نوع رقیق کننده اسپرم به شرح زیر استفاده شد:

تیمار اول) شامل ۵/۵۴ گرم NaCl، ۲/۴۲۲ گرم Tris، ۳/۵۷ گرم Glycin که در pH معادل ۸/۴ تنظیم شد. برای آماده سازی این رقیق کننده مواد شیمیایی مربوطه بر حسب گرم و با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ توزین گردید و به وسیله دستگاه همزن مغناطیسی در یک لیتر آب مقطر به طور کامل حل شد و pH محلول به روش تیتراسیون و با استفاده از NaOH و HCl تنظیم شد (لرستانی، ۱۳۸۳). تیمار دوم) شامل ۷/۳۰۵ گرم NaCL و ۰/۷۳۵ گرم $Cacl_2.2H_2O$ که در pH معادل ۷/۷ به روش تیتراسیون تنظیم شدند. برای آماده سازی رقیق کننده فوق، مواد شیمیایی مربوطه با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم و به وسیله دستگاه همزن مغناطیسی در یک لیتر آب مقطر به طور کامل حل و pH محلول به روش تیتراسیون و با استفاده از NaOH و HCl تنظیم شد (لرستانی، ۱۳۸۳). تیمار سوم) فقط مایع تخمدانی. جهت تهیه مایع تخمدانی ابتدا از ماهی مولد ماده تخمک گیری شد و سپس مایع تخمدانی به وسیله توری انکوباتور تراف از تخمک جدا گردید (لرستانی و همکاران، ۱۳۸۵). تیمار چهارم) آب مقطر که بعنوان تیمار شاهد استفاده گردید. جهت بررسی تحرک اسپرم، درصد اسپرم های متحرک بلافاصله بعد از فعال شدن به صورت چشمی انجام شد (Alavi *et al,* 2006). برای این منظور از میکروسکوپ فازکنتراست(Leica dfc 295) مجهز به دوربین پاناسونیک با عدسی شیئی ۴۰ X استفاده شد. در بررسی مایع منی، زمان تحرک اسپرم‌ها بلافاصله پس

از مخلوط کردن و از لحظه تماس با آب تا زمانی که ۱۰۰ درصد اسپرماتوزوا از تحرک باز ایستادند با استفاده از زمان سنج دیجیتال محاسبه شد(Linhart *et al.*, 1995; Alavi *et al.*, 2006).تراکم اسپرم نیز توسط روش استاندارد هماسیتومتری (برادران نویری و همکاران، ۱۳۸۶) با رقیق سازی اسپرم به نسبت ۱:۱۰۰۰ و با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست (Leica dfc 295) با عدسی شیئی X۱۰ اندازه گیری شده و با واحد $۱۰^{۹}$× در هر میلی لیتر منی ثبت شد. به منظور محاسبه میزان اسپرماتوکریت از اسپرم مولدها نمونه برداری شد. نمونه برداری بوسیله لوله میکروهماتوکریت انجام گرفت (Rakitin *et al.*, 1999; Tvedt, 2001; Aas *et al.*, 1991). همچنین با استفاده از سرنگ انسولین حجم اسپرم-دهی ماهیان اندازه‌گیری شد. برای اندازه گیری اسیدیته منی، نمونه‌های منی درون ویال‌های ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد، و ابتدا به مدت ۲ دقیقه در ۵۰۰ دور و در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند(Linhart *et al.*,1991). بعد از سانتریفیوژ، پلاسمای منی که در قسمت بالای ویال قرار دارد به درون لوله‌های آزمایش منتقل و میزان اسیدیته بوسیله pH متر اندازه گیری شد.

برای مراحل انکوباسیون تخم ماهی شیزوتوراکس زارودنی از دو نوع انکوباتور ویس و تراف کالیفرنیایی استفاده شد. به این ترتیب که از شروع تا مرحله چشم زدگی تخم ها از انکوباتور ویس و از مرحله ی چشم زدگی تا پایان از تراف های کالیفرنیایی استفاده شد. در هر انکوباتور ویس مقدار ۲۰۰ سی سی تخم ریخته و جریان آب در آن برقرار شد. تاریخ و ساعت بارگذاری در هر انکوباتور و شماره مولدی که تخم از آن استحصال شده بود، ثبت می شد. تخم های درون ویس ها هر ۴ ساعت با مالاشیت گرین به میزان ppm ۰/۱ ضدعفونی می شدند (لرستانی و کلباسی، ۱۳۸۵). پس از اینکه تمامی تخم های موجود در هر انکوباتور ویس به مرحله چشم زده رسیدند، به تراف های کالیفرنیایی منتقل شدند. تخم‌های چشم زده در تراف های طبقاتی کالیفرنیایی که توری آن ها متناسب با اندازه تخم های ماهی شیزوتوراکس زارودنی اصلاح شده بود، به نحو مناسبی در هر سینی قرار می گرفتند. لارو های هچ شده از میانه شکاف حد واصل بین توری و جعبه سینی تراف های طبقاتی عبور و با جریان آب وارد تراف دیگری می شد که جهت جمع آوری و نگهداری لارو تعبیه شده بودند. در طول انجام این تحقیق، میانگین و انحراف معیار دمای آب انکوباتورهای ویس و انکوباتورهای طبقاتی کالیفرنیایی ۲/۵۵ ± ۱۵/۶۶ درجه سانتیگراد و میانگین و انحراف معیار دمای آب حوضچه های نگهداری مولدها ۲/۰۴ ± ۱۶/۲۸ و pH معادل ۸/۵ و شوری آب ۰/۳ میلی گرم در لیتر بود.

با نمایان شدن دو لکه چشمی (غالبا تقریباً ۵-۶ روز بعد از لقاح) در تخم ها امکان دستکاری آن ها و تعیین درصد چشم زدگی فرآهم گردید. با شمارش تخمهای چشم زده و نیز سفید و با استفاده از فرمول زیر درصد چشم زدگی محاسبه شد:

درصد چشم زدگی=(تعداد کل تخم/تعداد تخم های چشم زده)×۱۰۰

تخم های چشم زده بعد از جدا کردن تلفات مرحله چشم زدگی و تا مرحله تخم گشایی که ۷ روز بعد از لقاح اتفاق افتاد به انکوباتورهای تراف منتقل در آنجا باقی ماندند. درصد تخم گشایی طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

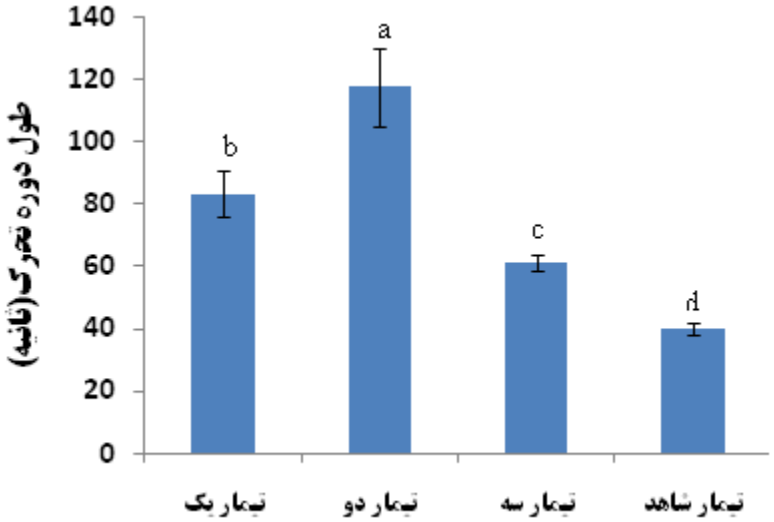
درصد تخم گشایی= (تعداد کل تخم/تعداد تخم های تخم گشایی شده)× ۱۰۰

از چشم زدگی و تخم گشایی به عنوان شاخصی از درصد لقاح استفاده شده است (Gharaei *et al.*, 2011)

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها و تعیین سطوح اختلاف بین گروههای تیماری از آزمون آنالیز یک طرفه واریانس (ANOVA) ($p<0.05$) و برای مقایسه میانگین بین تیمارها از آزمون دانکن در محیط نرم افزارSPSS ویرایش ۱۴ استفاده شد.

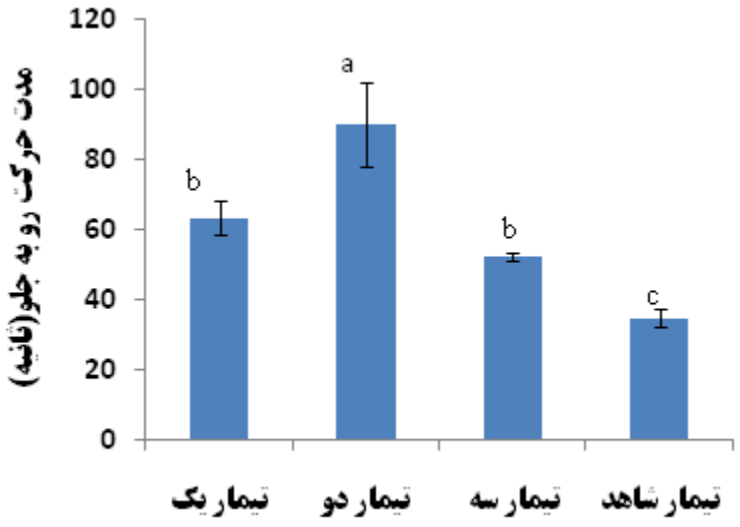
نتایج

براساس نتایج به دست آمده از طول دوره تحرک در رقیق کننده ها، مایع تخمدانی و شاهد مشخص شد که طول دوره تحرک در بین تیمارهای مختلف معنی دار می باشد ($p<۰/۰۵$) بطوریکه بیشترین طول دوره تحرک در تیمار دوم (۱۱۷/۸۰±۱۲/۶۵ ثانیه) و کمترین طول دوره تحرک در تیمار چهارم یا تیمار شاهد (۴۰/۰۰±۱/۷۳ ثانیه) می باشد (شکل ۱).



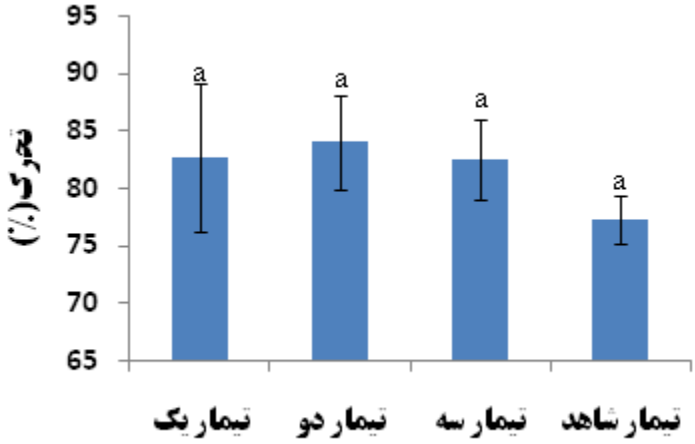
شکل ۱ – نمودار مقایسه طول دوره تحرک اسپرماتوزوا ماهی شیزوتوراکس زارودنی در تیمارهای مختلف . حروف غیر متشابه بر روی ستون ها اختلاف معنی دار در سطح ۹۵ درصد اطمینان را نشان می دهند.

مدت حرکت رو به جلو در بین همه تیمارها باستثنای تیمار اول و سوم معنی دار بود ($p<۰/۰۵$)، بطوریکه بیشترین مدت حرکت رو به جلو در تیمار دوم (۹۰/۰۰±۱۲/۰۶ ثانیه) و کمترین مدت حرکت رو به جلو در تیمار چهارم یا تیمار شاهد (۳۴/۶۶±۲/۵۱ ثانیه) ثبت شد. تیمار اول با وجود عدم معنی دار بودن با تیمار سوم، مدت حرکت روبه جلوی بیشتری داشت (شکل۲).



شکل ۲- نمودار مقایسه مدت حرکت رو به جلو اسپرماتوزوا ماهی شیزوتوراکس زارودنی در تیمارهای مختلف . حروف غیر متشابه بر روی ستون ها اختلاف معنی دار در سطح ۹۵ درصد اطمینان را نشان می دهند.

شاخص درصد تحرک در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری را نشان نداد (p<۰/۰۵). بیشترین درصد تحرک در تیمار دوم (۸۴/۰۰±۴/۱۶) و کمترین درصد تحرک در تیمار چهارم (تیمار شاهد) (۷۳/۳۳±۲/۰۸) بود (شکل ۳)

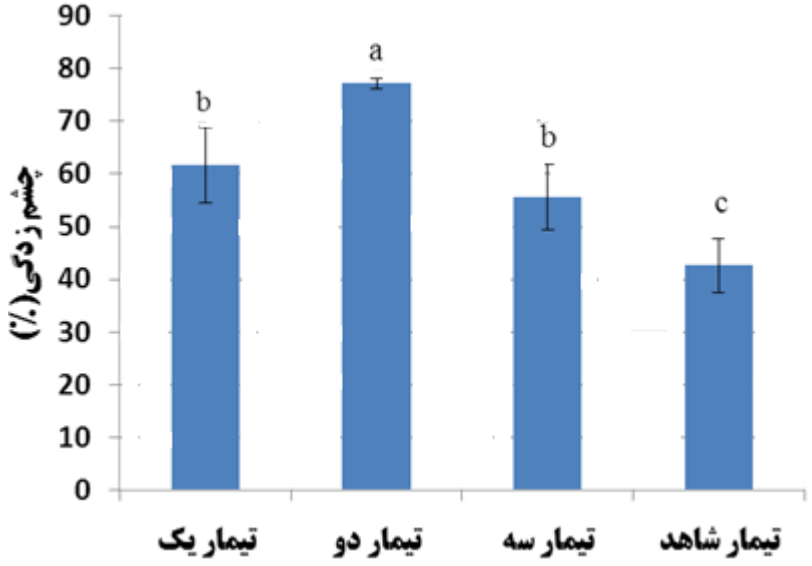


شکل ۳- نمودار مقایسه درصد تحرک اسپرماتوزوا ماهی شیزوتوراکس زارودنی در تیمارهای مختلف . حروف مشابه روی ستون ها عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۹۵ درصد اطمینان در بین تیمارها را نشان می دهند.

با بررسی میزان pH بیشترین pH مخلوط مایع اسپرمی ۸/۰۵ و کمترین آن ۷/۹۰ و میانگین کل به میزان ۷/۹۷±۰/۰۴ بود. میانگین pH مایع تخمدانی ۸/۱۴±۰/۰۱ اندازه گیری گردید. بیشترین

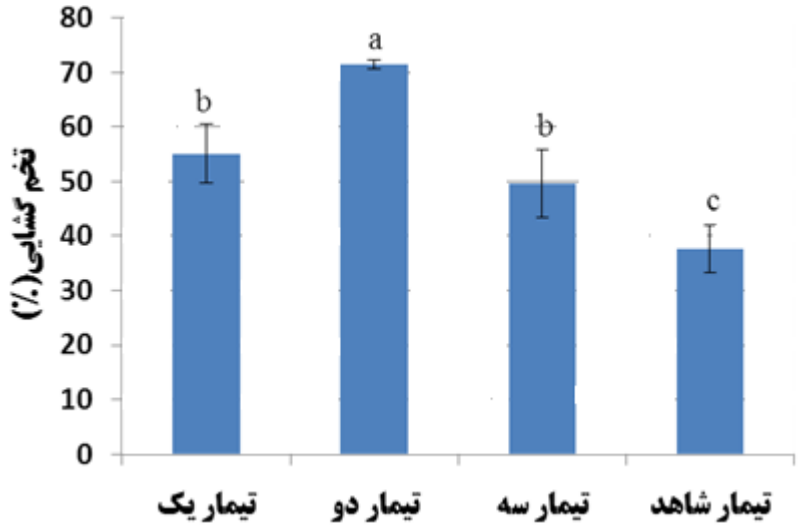
میزان درصد اسپرماتوکریت مخلوط اسپرم مولدین ماهی شیزوتوراکس زارودنی ۳۷ و کمترین آن ۳۴ و میانگین کل ۰/۹۹± ۳۵/۵۸ درصد بودند.
میزان مولدین ماهی شیزوتوراکس نیز نشان داد که بیشترین تراکم مخلوط اسپرم $۱۰^{۹}$ ×۰/۸۹ و کمترین آن $۱۰^{۹}$ ×۰/۵۶ و میانگین کل به میزان$۱۰^{۹}$×۰/۱۰۶± $۱۰^{۹}$ ×۰/۷۰۱ در میلی لیتر محاسبه شد. همچنین ارزیابی شاخص حجم اسپرم دهی هر مولد انجام شد. بیشترین حجم اسپرم دهی مولدین ۹ میلی لیتر و کمترین آن ۳ میلی لیتر و میانگین کل ۱/۵۷± ۴/۷ میلی لیتر ثبت شد.

همان گونه که در نمودار (شکل ۴) مشاهده می شود درصد چشم زدگی در بین همه تیمارها باستثنای تیمار اول و سوم معنی دار می باشند (p<۰/۰۵). بیشترین درصد چشم زدگی در تیمار دوم (۷۷/۲۵±۰/۹۷) و کمترین درصد چشم زدگی در تیمار شاهد (۴۲/۵۹±۵/۰۲) می باشد. اما در تیمار اول با وجود عدم معنی دار بودن اختلاف آن با تیمار سوم (مایع تخمدانی)، درصد چشم زدگی بیشتری ثبت گردید.



شکل ۴-نمودار مقایسه درصد چشم زدگی تخم ماهی شیزوتوراکس زارودنی در تیمارهای مختلف . حروف غیر متشابه بر روی ستون ها اختلاف معنی دار در سطح ۹۵ درصد اطمینان را نشان می دهند.

نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان می دهد که درصد تخم گشایی در بین همه تیمارهای به استثنای تیمار اول و سوم معنی دار می باشد (p<۰/۰۵). بیشترین درصد تخم گشایی در تیمار دوم (۷۱/۴۳±۰/۸۱) و کمترین درصد تخم گشایی در تیمار چهارم یا تیمار شاهد (۳۷/۷۲±۴/۳۲) است. در تیمار اول با وجود عدم معنی دار بودن با تیمار سوم، درصد چشم زدگی بیشتری وجود داشت (نمودار شکل ۵).



شکل ۵- نمودارمقایسه درصد تخم گشایی ماهی شیزوتوراکس زارودنی در تیمارهای مختلف . حروف غیر متشابه بر روی ستون ها اختلاف معنی دار در سطح ۹۵ درصد اطمینان را نشان می دهند.

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد در مقایسه تمامی تیمارها از لحاظ مدت زمان تحرک اختلاف معنی داری وجود دارد (p<۰/۰۵) و بیشترین طول دوره تحرک اسپرم در تیمار شماره دو (۱۱۷/۸۰±۱۲/۶۵ ثانیه) و کمترین آن در تیمار شاهد (۴۰/۰۰±۱/۷۳ ثانیه) مشاهده شد. بیشتر بودن طول دوره تحرک اسپرماتوزوای ماهی شیزوتوراکس در تیمار اول و دوم احتمالا به علت نزدیک بودن فشار اسمزی این دو تیمار با مایع اسپرمی باشد که در نتیجه اثر زیانبخش کمتری بر اسپرم ماهی دارد (Alavi & Cosson, 2005). همچنین وجود یون هایی از قبیل سدیم و کلسیم و تنظیم pH در این محلول ها اثر تقویت کننده بر اسپرم داشته است. این نتایج با نتایج دیگر مطالعات که نشان دادند تحرک اسپرم ماهیان استخوانی (Billard *et al.*, 1995) و ماهیان خاویاری (Linhart *et al.*, 2002) در محلول های نمکی در مقایسه با آب طولانی تر می شود همخوانی دارد. مطالعه انجام شده بر روی ماهی کپور معمولی نیز نشان داد که محلولهای رقیق کننده نمکی با حفظ ساختار تاژک اسپرم مدت زمان تحرک را در مقایسه با آب افزایش می دهند (احمدیان و همکاران، ۱۳۸۱).

همچنین مطالعه انجام شده بر روی اسپرماتوزوای ماهی قزل آلای رنگین کمان نیز نشان داد محلول رقیق کننده $NaCl+CaCl_2 . 2H2o$ (مشابه با تیمار دوم در این تحقیق) باعث افزایش مدت زمان تحرک اسپرم در ماهی قزل آلای رنگین کمان می شود (لرستانی و کلباسی، ۱۳۸۵). کم بودن زمان تحرک اسپرم به علت مصرف سریع ATP خارج سلولی و ناتوانی میتوکندری ها در تامین نیاز انرژی تاژک می باشد (Billard, 1992). در این خصوص افزایش یون کلسیم خارج سلولی می تواند تحرک اسپرماتوزوئید را بهبود بخشد. مطالعه بر روی اسپرم ماهی قزل آلا نشان داده که آغاز تحرک اسپرم این

ماهی احتمالا به دلیل تغییر در پتانسیل غشاء بعد از رقیق شدن توسط آب شیرین و کاهش غلظت K^+ می باشد (Cosson *et al.*, 1999).

مقایسه ترکیبات رقیق کننده های اول و دوم نشان می دهد که احتمالاً وجود یون کلسیم در ترکیب تیمار دوم، به عنوان یون ضروری برای آغاز تحرک اسپرماتوزوا ، دلیل موفقیت این تیمار نسبت به سایر تیمارها است. یون کلسیم مهم ترین عامل برای القاء و تمدید مدت زمان تحرک اسپرم است (لرستانی، ۱۳۸۳ ,Billard & Cosson., 1992;). نتایج سایر مطالعات نیز نشان داده است با اضافه کردن یک میلی مول کلسیم به محلول های رقیق کننده اسپرم، مدت زمان تحرک اسپرم به بیش از ۳۰ ثانیه افزایش می یابد (احمدی و همکاران، ۱۳۸۷). به نظر می رسد وجود یون های کلسیم و سدیم که اثر تشدیدکنندگی بر مدت زمان تحرک اسپرماتوزوا دارند (یگانه، ۱۳۸۱)، دلیل عملکرد مناسب تر رقیق کننده های اول و دوم بر مدت زمان تحرک اسپرم نسبت به سایر تیمارها باشد.

تحرک اسپرماتوزوای ماهیان بعد از انتقال اسپرم به محیط آبی (در تولید مثل طبیعی) یا رقیق کننده ها (در تکثیر مصنوعی) آغاز می شود (Toth et al., 1997; Cosson *et al.*, 1999). محیط های مصنوعی جدید معمولا از نظر یونی و فشار اسمزی با مایع اسپرمی متفاوت بوده و اسپرم ماهی باید خود را با محیط جدید سازگار کند. در واقع تحرک اسپرماتوزا به حساسیت آن به یون و فشار اسمزی بستگی دارد (Toth *et al.*, 1997; Cosson *et al.*, 1999).

نتایج این تحقیق نشان داد که مایع تخمدانی بطور معنی داری باعث افزایش مدت تحرک اسپرم ماهی شیزوتوراکس نسبت به آب می شود که نتیجه حاضر با مطالعات صورت گرفته در خصوص آزاد ماهیان (Turner & Montgomerie, 2002) و ماهی کاد اقیانوس اطلس (Litvak & Triple., 1998) مطابقت دارد. همانگونه در نتایج ذکر شده است از میان تیمارهای مطالعه شده، مایع تخمدانی ماهی شیزوتوراکس نسبت به تیمارهای اول و دوم تاثیر کمتری بر طول دوره تحرک اسپرم داشته است. که این موضوع مطابق با مطالعات صورت گرفته بر تاثیر مایع تخمدانی بر تحرک اسپرماتوزوای ماهی کفال خاکستری (یگانه، ۱۳۸۱) و ماهیان خاویاری (احمدیان، ۱۳۷۹;Dettlaf *et al.*, 1993) است. لذا، می توان اظهار داشت که اسپرم ماهی شیزوتوراکس نیز در مایع تخمدانی غیر فعال می شود. این امر می تواند به علت پایین بودن فشار اسمزی مایع تخمدانی باشد. البته نتایج دیگر مطالعات بر روی ماهی چار (*Salvelinus alpinus*) (Turner & Montgomerie, 2002) و ماهی آزاد دریای خزر (Hatef *et al.*, 2007) و ماهی کاد (*Gadus morhua*) (Litvak & Tripple, 1998) نشان دهنده تاثیر مثبت مایع تخمدانی خصوصاً در غلظت های بالا بوده اند.

مشخص شده است pH محیط لقاح تاثیر زیادی در میزان موفقیت لقاح دارد بطوریکه شرایط قلیایی مشابه یا بالاتر از مایع منی یا مایع تخمدانی باعث تحرک و لقاح بیشتر در اسپرماتوزوای آزاد ماهیان می شود (Cosson *et al.*, 1999). pH مایع منی ماهی شیزوتوراکس نیز بطور متوسط ۷/۹ و pH مایع تخمدانی بطور متوسط ۸/۱۴ اندازه

گیری شد که pH مایع رقیق کننده تیمار دوم در حدود pH مایع منی و pH مایع رقیق کننده تیمار اول نیز در حد مایع تخمدانی بود. عملکرد مناسب این دو رقیق کننده در مقایسه با گروه شاهد دور از انتظار نمی تواند باشد، زیرا این دو محلول علاوه بر داشتن pH مناسب، حاوی یون کلسیم و سدیم بودند و یون های سدیم و کلسیم می توانند شدت مهار کنندگی پتاسیم مایع منی بر تحرک اسپرم را کاهش دهند (Toth et al., 1997; Linhart *et al.*, 1991). اثر فوق برای یون های دو ظرفیتی مانند کلسیم شدیدتر بوده و احتمالا به دلیل وجود یون کلسیم در ترکیب تیمار دوم باعث عملکرد بهتر آن در مقایسه با تیمار اول باشد (Billard & Cosson., 1992). مطابق نتایج ارائه شده، فعال سازی آب (تیمار شاهد) کمترین مدت زمان تحرک را در مقایسه با تیمارهای اول و دوم و سوم نشان می دهد. اسپرماتوزوا بعد از قرار گرفتن در معرض آب تغییرات ساختاری سریعی در جهت نابودی نشان داده، لذا بدین دلیل عمر گامت ها در آب بسیار کوتاه است (Billard, 1992).

فاکتورهای محیطی از قبیل دما، ترکیب یونی، pH و فشار اسمزی از عوامل تنظیم کننده تحرک اسپرم در ماهی شیزوتوراکس مانند سایر ماهیان استخوانی (Billard *et al*,. 1995; Lahnsteiner *et al.*, 1997) و ماهیان خاویاری (Linhart *et al.*, 2002; Toth *et al.*, 1997) هستند.

افزایش مدت زمان تحرک اسپرم شانس رسیدن اسپرم ها به میکروپیل و انجام عمل لقاح را افزایش داده و در نتیجه میزان لقاح تخمکها افزایش یافته است. از آنجا که نقطه منحصر به فردی برای نفوذ اسپرماتوزوا در تخمک (میکروپیل) وجود دارد و طول مسیر حرکت یک اسپرماتوزوا (۳ mm) کوتاهتر از قطر تخمک (۶-۴ mm) است بنابراین حتی اسپرماتوزوا های نزدیک به تخمک نیز شانس رسیدن به میکروپیل را ندارند (Billard, 1992) و واضح است که افزایش مدت زمان تحرک اسپرماتوزوا شانس رسیدن آنان به میکروپیل را زیادتر می کند.

درصد چشم زدگی تخمها می تواند به عنوان معیاری برای سنجش درصد لقاح، قابلیت لقاحی اسپرم و تخمک تلقی شود. از آنجا که در مطالعه حاضر از مخلوط تخمک چندین مولد ماده استفاده شده است بنابراین درصد چشم زدگی تخم ها می تواند نشان دهنده قابلیت اسپرم برای انجام لقاح باشد (Aas *et al.*, 1991).میزان چشم زدگی با اسپرماتوزوئیدهای فعال شده با تیمار دوم و اول که بیشترین میزان طول دوره تحرک اسپرم و مدت زمان تحرک اسپرم را نیز نشان دادند، همخوانی دارد. زیرا بیشترین میزان چشم زدگی در تیمار های دوم و اول ، سپس در تیمار سوم و نهایتا در تیمار چهارم مشاهده شد که با نتایج مربوط به مدت زمان حرکت اسپرم تیمارها همخوانی دارد. رابطه مثبت و معنی دار مشاهده شده در این مطالعه مابین تحرک اسپرم و درصد چشم زدگی و تخم گشایی حاصل از تیمارهای مختلف با سایر مطالعات انجام شده بر روی ماهی قزل آلای رنگین کمان (Cierezko & Dabrowski, 1993) ماهی قره برون (Alavi & Cosson, 2004) همخوانی دارد.

به طورکلی استفاده از محلول های نمکی برای لقاح مصنوعی نسبت به آب و مایع تخمدانی مزایای بیشتری دارد. مهم ترین نتیجه ی استفاده از آنان کسب نرخ بالای لقاح در زمانیکه تخمک به وسیله زرده تخمک های معیوب آلوده شده است، می باشد. نرخ پایین لقاح در ماده های جوان که هنوز

پوسته تخمکشان محکم نیست و در زمان تخم کشی به آسانی شکسته می شوند متداول است. در این زمان اگر آب به این تخمک ها اضافه شود زرده رسوب می کند و اسپرماتوزوا بهم می چسبند و مانع از تحرک آنها می شوند و همچنین باعث بسته شدن سوراخ میکروپیل می شوند. زمانی که بیش از ۱٪ تخمک ها شکسته باشد هیچ لقاحی صورت نمی گیرد. بنابراین استفاده از محلول های رقیق کننده ی مناسب می تواند با انحلال زرده در داخل خود جلوی تشکیل این رسوب را گرفته و نرخ لقاح را بهبود بخشد (Billard, 1992).

در نهایت می توان نتیجه گرفت که محلول های رقیق کننده و مایع تخمدانی در مقایسه با آب زمان تحرک و در نتیجه درصد چشم زدگی و تخم گشایی بیشتری را سبب شده و استفاده از آن ها بازده تکثیر مصنوعی را بیشتر می کند. مضافا برای مقایسه ی اثر بخشی مایع تخمدانی و محلولهای رقیق کننده می توان اظهار داشت که ، چون مایع تخمدانی بدون هزینه ی اضافی و توسط ماهی ماده تولید می شود استفاده از مایع تخمدانی خالص و عاری از مواد زائد در تکثیر ماهی سفیدک سیستان می تواند علاوه بر افزایش عملکرد تکثیر، از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه باشد.

منابع

احمدی، م.ر.، کلباسی، م.ر.، حسینی، ش. و لرستانی، ر. ۱۳۸۷.ریا، ارزیابی غلظت اسپرم ، اثر رقیق کننده ها و میزان pH آنها بر تحرک اسپرم کپور معمولی(*Cyprinus carpio*). *مجله علوم و فنون دریایی*، دوره ۷، شماره ۱و۲ ص ۱۳-۱۹.

احمدیان، ن. ۱۳۷۹.، مطالعه تطبیقی لقاح تخمک تاس ماهی ایرانی *Acipencer persicus* با استفاده از تقویت کننده های اسپرم. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی تربیت مدرس.

احمدیان، ن.، مجازی امیری، ب.، ابطحی، ب. و محمد نظری، ر. ۱۳۸۱.، استفاده از تقویت کننده های اسپرم در لقاح تخمک تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). *دومین همایش ملی- منطقه‌ای ماهیان خاویاری رشت*، صفحات ۱۱۱-۱۱۵.

ذبیحی، م. پورکاظمی، م. کاظمی، ر.، و کمالی، ا. ۱۳۸۲.، تعیین زمان تخم ریزی و تغییرات چرخه تولیدمثلی هامون ماهی (*Schizothorax zarudnyi*) بر مبنای شاخص وزنی گناد، شاخص وزنی کبد و شاخص چاقی. مجله علمی شیلات ایران. سال ۱۲. شماره ۴.

لرستانی، ر. ۱۳۸۳.، اثر محلولهای متفاوت تقویت کننده اسپرم و میزان اسپرماتوکریت بر روند تکثیر ماهی قزل آلای رنگین کمان. سمینار کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس ۴۲ ص.

لرستانی، ر. و کلباسی، م. ر. ۱۳۸۵.، اثر رقیق کننده های مختلف بر مدت زمان تحرک اسپرم ماهی قزل الای رنگین کمان *(Oncorhynchus mykiss)* . *مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی*. جلد ۱۳ شماره ۶.

لرستانی، ر. کلباسی، م. حسینی، ش. احمدی، م. ۱۳۸۷.، ارزیابی غلظت اسپرم اثر فعال کننده ها و میزان pH آنها بر تحرک اسپرم کپور

معمولی، مجله علوم و فنون دریایی، دوره هفتم، شماره ۱ و۲، صفحات ۱۳-۱۹.

یگانه ، س. ۱۳۸۱.، اثر تقویت کننده ها بر مدت تحرک اسپرم و توان لقاح در کفال خاکستری *Mugil cephalus*. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، دانشکده منابع طبیعی کرج. ۱۱۲ ص.

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

Alavi, S.M.H. and Cosson, J. 2004. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology Internationl*, 30: 1-14.

Alavi, S.M.H., and Cosson, J., 2005. Sperm motility and fertilizing ability in the Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *Aquaculture Reserch*, 36: 841-850

Alavi, S. M. H., Cosson, J. and Kazemi, R., 2006. Semen characteristics in Acipencer persicus in relation to sequential stripping. Journal Application Ichthyology, 22: 400-405

Babiak, I., Glogowski, J., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski, H. and Strzezek, J., 2001. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. Theriogenology 55: 177-192.

Billard, R., 1992. Reproduction in rainbow trout: Sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gamets. *Aquaculture*, 100: 263-298.

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

Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., Linhart, O., 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 129: 95-112.

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

Cosson, J., Billard, R., Dreanno, C., Suquet, M., Cibert, C. 1999. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In the Mail Gamete from Basic Knowledege to Clinical Applications. Vienna, USA, pp. 161-186.

Dettlaff, T.A., Ginsburg, A. and Schmalhausen, S., 1993. Sturgeon Fishes. *Springer Verlog Berlin.*

Gharaei, A., Rahdari, A. and Ghaffari, M. 2011. Induced spawning of *Schizothorax zarudnyi* (Cyprinidae) by using synthetic hormones (Ovaprim and HCG). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 3(6): 518-522.

Hatef, A., Niksirat, H., Mojazi, B., Alavi, S. M. H. and Karami, M., 2007. Sperm density, seminal plasma composition and their physiological relationship in the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Aquaculture Research*, 38(11): 1175-1181.

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

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. and Patzner, R. A., 1997. Sperm motility and seminal composition in the Turbot (*Lota lota*). *Journal of Applied Ichthyology*, 13: 113–119.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. and Patzner, R. A.و 1998. Determination of semen quality of the rainbow trout by sperm motility, seminal plasma parameters and spermatozoa metabolism. *Aquaculture*, 163: 163-181.

Linhart, O., Slechta, V. and Slavik, T., 1991. Fish sperm composition and biochemistry. *Bulletin of Institute of Zoology. Academia Sinica. Monograph*. 16: 258-311.

902-909.

Linhart, O., Cosson, J., Mims, S. D., Shelton, W. L. and Rodina, M., 2002. Effects of ions on the motility of fresh and demembranated Paddlefish, (*Polyodon spathula*) spermatozoa. *Reproduction*, 124: 713-719.

Litvak, M. K. and Trippel, E. A., 1998. Sperm motility patterns of Atlantic cod (Gadus morhua) in relation to salinity: effect of ovarian fluid and egg presence. *Canadian Journal of Fisheries* and *Aquatic Sciences*. 55: 1871-1877.

Rakitin, A., Ferguson, M. and Trippel, E., 1999. Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic Cod *(Gadus morhua)*: correlation and variation during the spawning season. *Aquaculture*, 170: 349-358.

Rurangwa, E., Kime, D. E., Olllevier, F. and Nash, J.P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture Research*, 234: 1-28.

Toth, G. P., Ciereszko, A., Christ, S.A. and Dabrowski, K., 1997. Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*): activation and inhibition conditions. *Aquaculture*, 154: 337–348.

Turner, E and Montgomerie, R. 2002. Ovarian fluid enhances sperm movement in *Arectic charr*.

Journal of fish Biology. 60: 1570-1579.

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

Effect of diluent solutions on the fertilization of snow trout (*Schizothorax zarudnyi*)

Gharaei Ahmad*[1], Alizadeh Sargazi Abbas[2], Ghaffari Mostafa[3] , Javad Mirdar Harijani[4]

1. Department of fisheries, Hamoun International Wetland Research Institute and Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.
2. Department of fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.
3. Departemant of Fisheries, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.
4. Department of fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran

*Corresponding author: agharaei551@uoz.ac.ir

Received:9/04/2015 Accepted:29/12/2015

Abstract

In this study, the effects of semen diluent solutions on improvement of reproduction performance, by using the criteria such as: the rates of fertilization, percentage of eyed egg and hatching rates were studied. For this purpose eight female broods with average weight and length 1545.62±295.43 g and 54.37±3.85 cm, respectively and sixteen male broods were selected with average weight and length 623.08±180.69 g diluent solutions and 38.91±5.40 cm, respectively. After separation of eggs from coelomic fluids, they were fertilized with sperm using four different diluent solutions: 1- 5.54 g NaCl, 2.422 g Triss, 3.57 g Glycin, regulated in pH=8.4 and solution in 1L distilled water. 2- 7.305 g NaCl, 0.735 g $CaCl_2.2H_2O$, regulated in pH=8.4 and solution in 1L distilled water. 3- coelumic fluid that was separated from egg by using net and 4- distilled water as control treatment. The results showed that motility duration of sperm in 1th, 2nd, 3^{ed} and 4th treatments was 65.25±7.36, 30.8±12.83, 73.33±2.117, 40.00±1.61 sec, the duration of forward movement was 6.25±4.71, 15.00±12.63, 52.33±1.90, 34.66±2.51 sec. and percentage eyed eggs was 16.82±6.42, 53.00±4.66, 82.50±3.84, 73.33±2.08, respectively. Percentage hatching was 55.05±5.42, 71.43±0.81, 49.60±6.25, 37.72±4.32, respectively. The results of spermatology parameters, eyed egg percentage and hatching rates showed a significant differences between the 2nd treatment with the rest ($p \leq 0/05$). Thus, it can be suggested the 2nd treatment is an effective diluents solution for improving breeding performance of *S. zarudnyi*.

Key worlds*:* *Schizothorax zarudnyi*, Diluent solutions, Sperm motility, Sistan.