دانشگاه گنبد کاووس
نشریه "پژوهش‌های ماهی شناسی کاربردی"
دوره سوم، شماره سوم، پاییز ۹۴
http://jair.gonbad.ac.ir

تأثیر یون‌های منیزیم و کلسیم و pH درتحرک اسپرم ماهی قزل آلای خال‌قرمز *Salmo trutta* Linnaeus, 1758

هومن رجبی اسلامی*[1]، سیدپژمان حسینی‌شکرابی[1]، مهدی طالبی دارابی[2]، میلاد محمدی مقدم[3]

[1]استادیارگروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[2]دانشجوی دکتری شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[3]دانشجوی کارشناسی‌ارشد شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ ارسال: ۹۴/۵/۱۴ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۱۳

چکیده

این مطالعه جهت بررسی تأثیر محلول‌های فعال‌کننده واجد غلظت‌های مختلف کلسیم، منیزیم و تغییر pH در محلول استاندارد لقاح بیلارد بر میزان تحرک اسپرم قزل‌آلای خال‌قرمز انجام شد. مولدین نر پس از صید و بیهوشی اسپرم‌گیری شدند. تمام نمونه‌های اسپرم در ادامه با یکدیگر مخلوط شده و میزان تراکم اسپرم و اسپرماتوکریت آن به‌ترتیب برابر ۰/۸۷±۱۰/۳۰ میلیارد در میلی‌لیتر و ۰/۲۳±۵۸/۰ درصد محاسبه شد. محلول‌های فعال‌کننده آزمایشی با افزودن یون‌های دو ظرفیتی شامل کلسیم و منیزیم با غلظت ۱، ۲ و ۳ میلی‌مول بر لیتر به محلول بیلارد تهیه شد. سه تیمار دیگر نیز با تغییر در میزان pH محلول بیلارد (۸، ۸/۳۰ و ۹) آماده شدند. سپس مدت زمان تحرک اسپرم در هر یک از محلول‌های لقاح تعیین و با محلول استاندارد بیلارد (تیمار شاهد) مقایسه شد. بیشترین مدت زمان تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلای خال‌قرمز در محلول لقاح حاوی ۱ میلی مول یون کلسیم با مدت زمان ۸/۶±۶۴/۷ ثانیه مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با تیمار pH برابر ۸/۵۰ نداشت (p<۰/۰۱). کمترین مدت زمان تحرک اسپرم نیز در محلول لقاح با pH برابر ۹/۵ با مدت زمان ۲/۶±۲۴/۳ ثانیه نسبت به سایر تیمارها ثبت گردید (p<۰/۰۱). تفاوت معنی‌داری نیز بین مدت زمان تحرک اسپرم در تیمار حاوی محلول استاندارد بیلارد (تیمار شاهد) با تیمارهای حاوی ۱ میلی‌مول منیزیم، ۲ میلی‌مول منیزیم و pH برابر ۸ مشاهده نگردید (p<۰/۰۱). بیشترین مدت زمان تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلای خال‌قرمز در محلول لقاح حاوی ۱ میلی‌مول یون کلسیم نسبت به سایر یون‌های دو ظرفیتی مشاهده گردید. بنابراین نوع و غلظت یون‌های دو ظرفیتی و pH محلول‌های فعال کننده می‌توانند تحرک اسپرم ماهی را تحت تأثیر قرار دهند.

واژه‌های کلیدی: *S. trutta*، **کاتیون‌های دو ظرفیتی، pH، تحرک اسپرم، اسپرماتوکریت**

*مسئول مکاتبه: rajabi.h@srbiau.ac.ir

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-04-19]

مقدمه

قزل‌آلای خال‌قرمز (*Salmo trutta*) زیر گونه‌ای متعلق به خانواده آزاد ماهیان بوده اما برخلاف ماهی آزاد دریای خزر، این ماهی تمام دوره زندگی خود را در آب شیرین سپری کرده و وارد آب شور نمی‌شود (Moyle, 2002). پراکنش جغرافیایی جمعیت آن در راستای شرق (غرب از رودخانه‌های حوضه دریاچه آرال تا ایسلند در اروپا) و در راستای شمال (جنوب از شمال نروژ و شمال شرق روسیه تا کوه‌های اطلس در آفریقا) گزارش شده است (Kottelat and Freyhof, 2007; Coad, 2011). ماهیان قزل‌آلای خال‌قرمز بومی ایران در حوضه‌های خزر، دریاچه ارومیه و دریاچه نمک در جنوب البرز یافت می‌شوند (Hashemzadeh Segherloo *et al*., 2009, 2012). باتوجه به صید بی‌رویه، تخریب مناطق طبیعی تخم‌ریزی و آلودگی زیستگاه‌ها، جمعیت این نوع آزاد ماهی به‌شدت کاهش یافته و در فهرست قرمز گونه‌های درحال تهدید می‌باشد (Kiabi *et al*., 1999; Banagar *et al*., 2008).

استحصال گامت با کیفیت بالا از مولدین ماهیان وحشی از اهمیت زیادی برای حصول اطمینان از تولید نسل برای اهداف بازسازی ذخایر و آبزی‌پروری برخوردار است (Kjørsvik *et al*., 1990). از طرفی امروزه حفظ اسپرم قزل‌آلای خال‌قرمز توسط انجماد در راستای حفظ نسل، در دسترس بودن گامت، هماهنگ‌سازی لقاح و فعالیت‌های اصلاح‌نژاد رایج شده است (Nynca *et al*., 2014; Martínez-Páramo *et al*., 2009)، درحالی‌که نگهداری اسپرم ماهیان در شرایط انجماد منجر به افت کیفیت، کاهش تحرک و کاهش توانایی بارور کردن تخم می‌شود (Billard, 1983; Nynca *et al*., 2014). بنابراین استفاده از مواد مختلف جهت افزایش حرکت اسپرم ماهیان بیش از پیش اهمیت می‌یابد.

اسپرم، طی تولید مثل طبیعی در ماهیان تخم‌گذار پس از رهاسازی در محیط آبی و در ماهیان زنده‌زا پس از ورود به دستگاه تناسلی جنس ماده فعال و متحرک می‌شود (Stoss, 1983; Billard, 1986; Billard and Cosson, 1992). تحرک اسپرم ماهیان به‌عنوان یک عامل مهم در میزان موفقیت لقاح پس از رهاسازی به محیط طبیعی و یا مخلوط شدن با محلول‌های لقاح در شرایط پرورشی به عواملی همچون غلظت ترکیبات یونی موجود در محیط و پلاسمای منی، pH و دما بستگی دارد (Alavi and Cosson, 2005a,b; Alavi and Cosson, 2006).

مطالعات متعددی در زمینه اثر ترکیبات یونی مختلف بر تحرک اسپرم در کپور ماهیان (Billard and Cosson, 1992; Lahnsteiner *et al*.,1996; Linhart *et al*., 1991, 2003 a, b, c)، آزاد ماهیان (Billard and Cosson, 1990, 1992; Linhart *et al*., 1991) و ماهیان خاویاری (Linhart *et al*., 1991; Alavi and Cosson, 2005 a, b; Linhart *et al*., 2003 a, b, c) انجام پذیرفته است. برای مثال، طالبی دارابی و همکاران (Talebi Darabi *et al*., 2014) نشان دادند که افزودن کلسیم در محلول لقاح منجر به افزایش سه برابری مدت تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلا می‌گردد.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-04-19]

علی‌رغم وجود تحقیقات در زمینه‌های وضعیت فایلوژنتیک (Hashemzadeh Segherloo *et al*., 2012)، تغذیه (Rajabi Nejad *et al*., 2011) و فاکتورهای زیست محیطی (Triebskorn, 1998; Luckenbach *et al*., 2001) این گونه ماهی، پژوهش حاضر با توجه اهمیت قزل‌آلای خال‌قرمز به‌عنوان یکی از آزاد ماهیان بومی ایران و آسیب شدید ذخایر طبیعی آن در زیستگاه‌های طبیعی، با هدف بررسی اثر pH و یون‌های دو ظرفیتی کلسیم و منیزیم بر مدت تحرک اسپرم این گونه انجام شده است تا بتوان از این طریق به روش‌های حفظ ذخایر ارزشمند باقیمانده این گونه در منابع آب‌های طبیعی کشور با کمک تکنیک‌های بارورسازی مصنوعی توسط متخصصان کمک نمود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی محلول‌های لقاح: تعداد ۹ گروه آزمایشی (محلول لقاح) مختلف و یک گروه شاهد (محلول استاندارد لقاح بیلارد) در این مطالعه بررسی شدند. محلول استاندارد لقاح بیلارد با ترکیب ۱۲۵ میلی‌مول بر لیتر کلرید سدیم، ۳۰ میلی‌مول بر لیتر گلیسین، ۲۰ میلی‌مول بر لیتر تریس-هیدروکلراید ۱ درصد (pH = ۹) تهیه شد (Billard, 1983). سایر تیمارهای آزمایشی با افزودن ۱، ۲ و ۳ میلی‌مول بر لیتر کلرید کلسیم و همچنین ۱، ۲ و ۳ میلی‌مول بر لیتر کلرید منیزیم به محلول لقاح اولیه آماده شدند. سه تیمار باقی مانده نیز با تغییر میزان pH در محلول لقاح شاهد با کمک هیدروکسید سدیم و یا هیدروکلریک اسید برابر ۸، ۸/۵ و ۹/۵ تهیه گردیدند. تمام ترکیبات مربوطه به هریک از محلول ها درون یک بالن ژوژه ریخته شده با آب دیونیزه به حجم ۱ لیتر رسیده و در انتها توسط همزن مغناطیسی به خوبی حل شدند. میزان pH محلول‌ها در انتها با کمک سود و یا اسید رقیق تنظیم گردید. مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت سیگما (Sigma, UK) تهیه شد.

جمع‌آوری مولدین و اسپرم: تعداد ۱۰ قطعه مولد نر (وزن متوسط ۷۸/۲۵±۱۴۵۸/۳۳ گرم) به صورت کاملاً تصادفی در مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی تنکابن جدا گردیده و طول و وزن آنها پس از بیهوشی با عصاره پودر گل میخک (۱۵۰ میلی‌گرم درلیتر) و خشک کردن کامل بدن تعیین گردید. اسپرم‌کشی از هر مولد بلافاصله با استفاده از سرنگ ۵ میلی‌لیتری استریل انجام شد. میزان ۱±۴/۴۹ میلی‌لیتر اسپرم به این طریق از هر مولد به‌دست آمد. نمونه‌های اسپرم با دقت بدون اختلاط با آب، مدفوع، ادرار و یا خون جمع‌آوری شدند، تا از فعال‌سازی و تحرک احتمالی اسپرم جلوگیری شود. سپس اسپرم تمام ماهیان به‌خوبی با یکدیگر مخلوط گردید تا آثار ناشی از اختلاف ژنتیکی و تغذیه بین مولدین حذف و اسپرم مورد نظر برای تمامی تیمارها ویژگی یکسانی داشته باشد. اسپرم جمع‌آوری شده در نهایت داخل لوله آزمایش استریل ریخته شد و برای اندازه‌گیری ویژگی‌های کیفی اسپرم در محلول‌های مختلف، در دمای ۱±۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل گردید.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-04-19]

سنجش ویژگی‌های کیفی اسپرم

تراکم اسپرم: پس از رقیق‌سازی اسپرم به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ با محلول رقیق‌کننده (سرم فیزیولوژی ۰/۸۵ درصد)، ۵ میکرولیتر از آن به داخل یک لوله آزمایش ۵ میلی‌لیتری واجد سرم فیزیولوژیک ریخته و با چند تکان آرام همگن شد (Rurangwa *et al*., 2004). در ادامه ۱۰ میکرولیتر از مخلوط روی لام نئوبار ریخته شده و لامل با زاویه ۴۵ درجه به‌منظور تهیه یک گسترش یکنواخت روی آن قرار گرفت تا تعداد اسپرم‌ها زیرمیکروسکوپ نوری (بزرگ نمایی ×۴۰۰) طبق رابطه زیر شمارش شود (Coetzee and Menkveeld, 2001):

$$X=A\times۵\times۰۰۰۰۱\times۰۰۰۱$$

که X در آن برابر تعداد اسپرم در میلی‌لیتر و A برابر مجموع اسپرم در ۵ خانه از لام نئوبار است.

اسپرماتوکریت: لوله‌های موئینه محتوی اسپرم جهت اندازه‌گیری حجم اسپرماتوکریت از یک انتها با خمیر مخصوص مسدود شده و در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار (Sigma, UK) قرار گرفت و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سپس میزان اسپرماتوکریت با تقسیم حجم ماده سفید فشرده شده در کف به حجم کل، به صورت درصد محاسبه شد (Fitzpatrick *et al*., 2005).

میزان تحرک اسپرم: مدت زمان تحرک اسپرم توسط میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین (Leica, Japan) طبق روش کوسون و همکاران (Cosson, 2000) اندازه‌گیری شد. نمونه‌های اسپرم برای همین منظور با سرم فیزیولوژی ۰/۸۵ درصد به نسبت ۱ به ۲۰ در دمای اتاق (۳±۲۴ درجه سانتی‌گراد) رقیق گردید و ۱ میکرولیتر از اسپرم داخل لوله اپندورفی حاوی ۱۹ میکرولیتر محلول لقاح مرتبط با تیمار مربوطه ریخته شد. مخلوط پس از چند تکان آرام همگن و ۱ میکرولیتر از آن به سرعت روی لام نئوبار آغشته شد و با ۱ درصد پلی وینیل الکل (به‌منظور کاهش چسبندگی اسپرم) قرار گرفت. حرکت اسپرم توسط دوربین متصل به میکروسکوپ تا زمانی ثبت شد که ۱۰۰ درصد اسپرم‌ها از تحرک باز ایستادند. در ادامه درصد تحرک اسپرم‌ها با بازبینی فیلم‌ها محاسبه شد. اطلاعات تحرک اسپرم به صورت ۹۷ فریم در ثانیه و برای مدت زمان ۱۵۰ ثانیه پس از فعال‌سازی نمونه‌های اسپرم با محلول‌های مختلف لقاح ثبت شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تمام متغیرهای مورد مطالعه با پنج بار تکرار و برای هر یک از تیمارها به صورت میانگین±خطای استاندارد بیان شدند. ابتدا از آزمون کلموگروف- اسمیرنوف برای سنجش نرمالیته داده‌ها استفاده شد. سپس تفاوت بین میانگین داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way-ANOVA) و با

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-04-19]

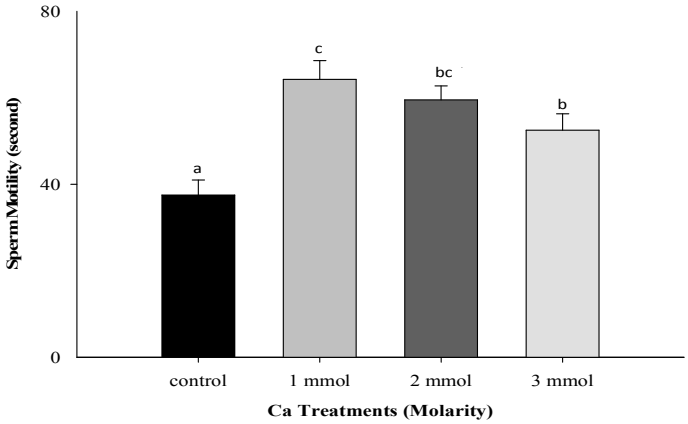
کمک آزمون توکی (Tukey's HSD) در سطح معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با کمک نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ انجام گرفته و نمودارها به کمک نرم‌افزار Sigma Plot ترسیم گردیدند.

نتایج

نتایج زیست‌سنجی قزل‌آلای خال‌قرمز همراه با تراکم اسپرم ماهیان و میزان اسپرماتوکریت در جدول ۱ خلاصه شده است. ماهیان دارای میانگین وزنی ۷۸/۲۵±۱۴۵۸گرم و طولی برابر ۵/۸۰±۴۶/۱۶ سانتی‌متر بودند. بررسی میزان تراکم اسپرم ماهیان آزمایشی نشان داد که تعداد ۰/۸۷±۱۰/۳۰ میلیارد عدد اسپرم در هر میلی‌لیتر از مایع منی آنها وجود دارد. همچنین میزان اسپرماتوکریت ماهیان قزل‌آلای خال‌قرمز برابر ۲/۳۰±۵۸/۰۰ درصد محاسبه گردید.

جدول ۱: برخی ویژگی‌های ریخت‌شناختی و اسپرم‌شناختی قزل‌آلای خال‌قرمز *S. trutta*

	سن (سال)	وزن (گرم)	طول (سانتی‌متر)	تراکم اسپرم (میلیارد در میلی‌لیتر)	اسپرماتوکریت (درصد)
S. trutta	۳	۱۴۵۸±۷۸/۲۵	۴۶/۱۶±۵/۸	۱۰/۳۰±۰/۸۷	۵۸/۰±۰/۲۳

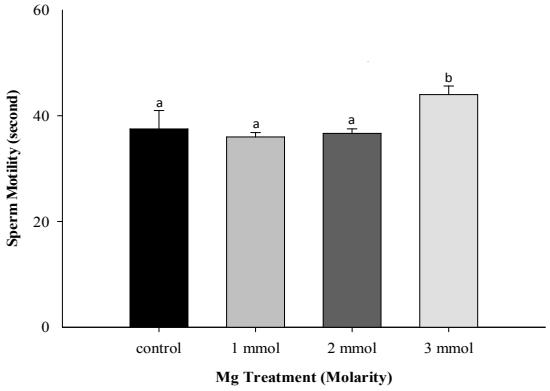


شکل ۱: مدت تحرک اسپرم قزل‌آلای خال‌قرمز *S. trutta* (میانگین±خطای استاندارد) در محلول‌های فعال‌سازی لقاح حاوی مقادیر مختلف کلسیم. حروف مشابه روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($p<۰/۰۱$).

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-04-19]

یافته‌ها نشان داد که مدت زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای خال‌قرمز به شکل معنی‌داری تحت تأثیر محلول‌های فعال‌کننده قرار گرفته است. افزودن غلظت‌های ۱ میلی‌مول کلسیم به محلول بیلارد موجب افزایش مدت تحرک اسپرم تا ۸/۶۰±۶۴/۷۰ ثانیه گردید که تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۱) با مدت زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای خال‌قرمز در تیمار شاهد (۳۷/۵۰ ثانیه) داشت. همچنین مدت زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای خال‌قرمز در تیمار حاوی ۱ میلی‌مول کلسیم به شکل معنی‌داری بیشتر از مدت تحرک اسپرم ماهی در تیمار حاوی ۳ میلی‌مول کلسیم بود (p<۰/۰۱).

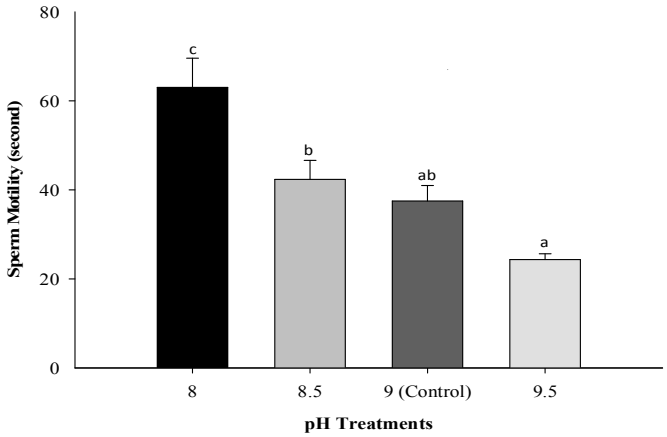
در حالی‌که منیزم تأثیر کمتری بر مدت زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای خال‌قرمز داشت (شکل ۲) افزودن ۱ و ۲ میلی‌مول منیزیم به هر میلی‌لیتر از محلول نمکی استاندارد بیلارد (تیمار شاهد) تأثیر معنی‌داری بر مدت زمان تحرک اسپرم نداشت (p<۰/۰۱). زمان تحرک اسپرم در تیمار حاوی ۱ میلی‌مول منیزیم برابر ۲/۰۰±۳۶/۰۱ ثانیه بود که مقدار این متغیر در تیمار ۲ میلی‌مول منیزیم برابر ۱/۵۰±۳۶/۶۶ ثانیه تعیین گردید. با این وجود افزایش غلظت یون منیزیم در محلول استاندارد بیلارد به ۳ میلی‌مول موجب افزایش معنی‌دار مدت زمان تحرک اسپرم با سایر تیمارهای آزمایشی گردید (p<۰/۰۱)، به شکلی که بیشترین میزان تحرک اسپرم تحت تأثیر منیزیم با ۳/۴۰±۴۴/۶۷ ثانیه در این تیمار به‌دست آمد (p<۰/۰۱).



شکل ۲: مدت تحرک اسپرم قزل‌آلای خال‌قرمز *S. trutta* (میانگین±خطای استاندارد) در محلول‌های فعال‌سازی لقاح حاوی مقادیر مختلف منیزیم. حروف مشابه روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (p<۰/۰۱).

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-04-19]

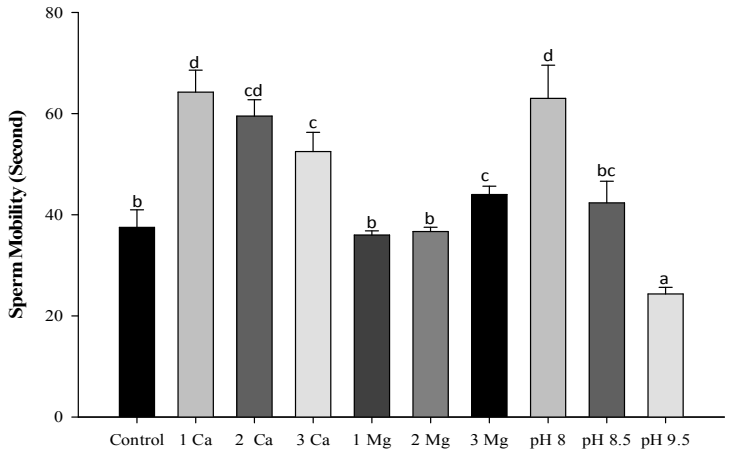
کاهش میزان pH محلول لقاح استاندارد تهیه شده باعث افزایش و افزایش قلیائیت محلول موجب کاهش مدت تحرک اسپرم‌ها شد (شکل ۳). بیشترین تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلای خال‌قرمز در استفاده از محلول لقاح با pH برابر ۸ با مدت زمان ۱۳/۱۰±۶۳/۰۰ ثانیه ثبت گردید که به شکل معنی‌داری بیش از سایر تیمارهای آزمایشی بود (p<۰/۰۱). مدت تحرک اسپرم در تیمار با pH برابر ۹/۵ به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها کمتر بود (شکل ۴) (p<۰/۰۱).



شکل ۳: مدت تحرک اسپرم قزل‌آلای خال‌قرمز *S. trutta* (میانگین±خطای استاندارد) در محلول‌های فعال‌سازی لقاح حاوی مقادیر مختلف pH. حروف مشابه روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (p<۰/۰۱)

بیشترین مدت زمان تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلای خال‌قرمز در محلول لقاح حاوی ۱ میلی‌مول یون کلسیم با مدت زمان ۸/۶۰±۶۴/۷۰ ثانیه مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با تیمارهای حاوی ۲ میلی‌مول کلسیم و تیمار با pH برابر ۸ نداشت (شکل ۴) (p<۰/۰۱). کمترین مدت زمان تحرک اسپرم نیز در تیمار با pH برابر ۹/۵ ثبت گردید که واجد اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارهای آزمایشی بود (شکل ۴) (p<۰/۰۱). با این وجود تفاوت معنی‌داری بین مدت زمان تحرک اسپرم در تیمار حاوی محلول استاندارد بیلارد (تیمار شاهد) با تیمارهای حاوی ۱ میلی‌مول منیزیم، ۲ میلی‌مول منیزیم و pH برابر ۸/۵ مشاهده نگردید (شکل ۴) (p<۰/۰۱).

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-04-19]



شکل ۴: مقایسه مدت تحرک اسپرم قزل‌آلای خال‌قرمز *S. trutta* در تیمارهای مختلف آزمایشی. حروف انگلیسی مشابه روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (p<۰/۰۱)

بحث و نتیجه‌گیری

ارتباط مستقیمی بین مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآ با میزان بارورسازی و موفقیت لقاح وجود دارد (Billard and Cosson, 1992; Cosson, 2004; Alavi and Cosson, 2005b). بالا بردن کیفیت گامت‌ها در فرآیند تکثیر ماهیان بر موفقیت فرآیند لقاح تأثیر بسزایی داشته که علاوه بر شرایط نگهداری و زیست بهتر مولدین، استفاده از محلول‌های فعال‌کننده یا لقاح برای بهبود این کیفیت مورد توجه کارشناسان قرار دارد. محلول بیلارد از مهمترین محلول‌های مورد استفاده متخصصان برای تکثیر گونه‌های خانواده آزاد ماهیان است (Nynca *et al*., 2014; Billard, 1983). از سوی دیگر ریداوت و همکاران (Rideout *et al*., 2004) بیان کردند که نسبت اسپرم‌های ناهنجار و مرده در ذخایر پرورشی روغن‌ماهی (*Melanogrammus aeglefinus*) بیشتر از ماهیان وحشی بوده و در نتیجه اسپرم روغن‌ماهی وحشی می‌تواند جهت لقاح مصنوعی مؤثرتر واقع شود. بنابراین نتایج این مطالعه می‌تواند برای بهبود دستیابی به محصولات تناسلی نر در تکثیر مصنوعی کاراتر قزل‌آلای خال‌قرمز در شرایط اسارت و پرورشی با استفاده از محلول لقاح مناسب و دستیابی به حداکثر زادآوری مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

نتایج نشان داد که مدت تحرک اسپرم قزل‌آلای خال‌قرمز در در تیمار حاوی ۱ میلی‌مول کلسیم بر لیتر بین محلول‌های فعال‌کننده واجد یون‌های دو ظرفیتی، کلسیم با ۱ میلی‌مول بر لیتر نسبت به

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-04-19]

سایرین بیشترین است. محققین متعددی گزارش نموده‌اند که یون کلسیم فاصله مسیر حرکت اسپرماتوزوآ را کم کرده اما مدت زمان تحرک را به‌طور چشمگیری افزایش می‌دهد (Billard and Cosson, 1992). همچنین افزایش مناسب و بهینه غلظت کلسیم درون سلولی بستگی به افزایش غلظت خارج سلولی آن داشته که این پدیده جهت آغاز فعال‌سازی تحرک اسپرماتوزوآی ماهیان از جمله آزاد ماهیان ضروری است (Kho *et al*., 2001; Alavi and Cosson, 2006). به‌طوری که یون کلسیم در شروع حرکت تاژک اسپرماتوزوآ نقش داشته و باعث کاهش ورود یون پتاسیم به‌عنوان عامل بازدارنده تحرک اسپرماتوزوآ در آزاد ماهیان (Stoss, 1983) و افزایش فعالیت آنزیم آدنیلات سیکلاز داخل سلولی در سلول اسپرم می‌شود (Billard and Cosson, 1992; Morisawa *et al*., 1983). روند نزولی کاهش تحرک اسپرم با افزایش غلظت کلسیم در محلول فعال‌کننده در نتایج تحقیق جاری مشابه نتایج طالبی دارابی و همکاران (Talebi Darabi *et al*., 2014) بوده که احتمالاً این کاهش به دلیل صرف انرژی بیشتر توسط اسپرماتوزوآ برای برقراری تعادل اسمزی به‌جای استفاده از انرژی موجود در میتوکندری‌ها برای حرکت تاژک بوده است (Cosson, 2004). مدت تحرک اسپرم قزل آلای خال‌قرمز در تمام تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف یون کلسیم در این مطالعه بیشتر از تیمار شاهد بود. احتمالاً افزایش غلظت خارج سلولی کلسیم قادر است که اثرات بازدارندگی یون پتاسیم بر تحرک اسپرم را از بین ببرد (Kho *et al*., 2001). علاوه بر این گزارش شده است که کلسیم از جمله یون‌های ضروری برای آغاز تحرک اسپرماتوزوآی قزل‌آلای رنگین‌کمان محسوب می‌شود (Billard and Cosson, 1992).

مطالعات انجام شده در خصوص نحوه تأثیر یون منیزیم روی تحرک اسپرم ماهیان حاکی از نقش آن در آغاز فعال‌سازی تحرک اسپرم و تداوم حرکت آن است (Rurangwa *et al*., 2004). گزارش شده که یون منیزیم با غلظت ۱۵ میلی‌مول بر لیتر تأثیر منفی روی تحرک اسپرم ماهی خاویاری (خانواده Acipenseridae) دارد (Alavi and Cosson, 2005b). ۳ میلی‌مول بر لیتر غلظت یون منیزیم در محلول لقاح موجب افزایش زمان تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تا ۱/۶۰±۷۰/۰۰ ثانیه شده است (Talebi Darabi *et al*., 2014). در پژوهش حاضر نیز بیشترین مدت زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای خال‌قرمز در بالاترین غلظت یون منیزیم (۳ میلی‌مول بر لیتر) رخ داد اما میزان تأثیر آن نسبت به گزارش نتایج تحقیقات اشاره شده در بالا به مراتب کمتر بود. همچنین تیمارهای حاوی غلظت‌های متفاوت کلسیم مدت زمان تحرک اسپرم به مراتب بیشتری در مقایسه با یون منیزیم نشان دادند. بنابراین به نظر می‌رسد بروز تأثیر فزاینده بر مدت زمان تحرک اسپرم در ازای افزایش یون منیزیم تا یک غلظت مشخص دربین ماهیان مختلف با خصوصیات اسپرم‌شناختی مختلف آنها مرتبط می‌باشد.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-04-19]

اثر pH محلول‌های فعال‌کننده بر مدت تحرک اسپرم ماهیان مختلف گزارش شده است (Sahinoz *et al*., 2007; Alavi and Cosson, 2005a; Lahnsteiner *et al*., 1998)، به‌طوری‌که شرایط قلیایی یا pH مشابه یا بیشتر از پلاسمای منی و یا مایع تخمدانی منجر به افزایش تحرک و توانایی لقاح اسپرم آزاد ماهیان می‌شود (Billard *et al*., 1974; Billard, 1981). البته افزایش pH محلول‌های فعال‌کننده به‌وسیله هیدرواکسید سدیم به واسطه افزایش یون سدیم تحرک اسپرماتوزآی ماهیان را در محیط کاهش می‌دهد (Alavi and Cosson, 2006; Billard, 1983). این روند کاهشی در مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآ با افزایش pH محلول‌های لقاح در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Talebi Darabi *et al*., 2014)، مار ماهی خاردار (*Mastacembelus mastacembelus*) (Sahinoz *et al*., 2007) و ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Saad and Billard, 1987) و هامور ملاباری (*Epinephelus malabricus*) (Chao *et al*., 1992) نیز گزارش شده است. پژوهش حاضر نشان داد که pH بر مدت زمان تحرک اسپرماتوزآی ماهی قزل‌آلای خال‌قرمز تأثیرگذار بوده و بیشترین میزان تحرک اسپرم در محلول حاوی pH برابر ۸ حاصل شد و به‌تدریج یک روند کاهشی در مدت زمان تحرک اسپرماتوزآ با افزایش میزان اسیدیته رخ داد.

تولید گامت‌های با کیفیت یکی از مهم‌ترین مسائل مربوط به تکثیر آبزیان بوده و نتایج پژوهش حاضر نشان داد که نوع و غلظت یون‌های دو ظرفیتی و pH محلول‌های فعال‌کننده می‌تواند تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلای خال‌قرمز را افزایش داده و در اهداف بازسازی ذخایر و یا پرورش این گونه با ارزش به حداکثر زادآوری دست یافت. در پژوهش حاضر افزایش زمان تحرک اسپرماتوزآ در محلول استاندارد بیلارد به‌عنوان تیمار شاهد به بیش از ۱/۵ برابر به‌طور همزمان در تیمارهای حاوی ۱ میلی‌مول بر لیتر کلسیم و pH برابر ۸ رسید که نشان‌دهنده آثار مثبت حضور یون‌های دو ظرفیتی همراه با کاهش pH در مدت تحرک اسپرماتوزآ ماهی قزل‌آلای خال‌قرمز است. پیشنهاد می‌گردد اثرات هم‌افزایی (سینرژیستیک) مؤثرترین غلظت‌های مختلف از یون‌های یک ظرفیتی و دو ظرفیتی همراه با تغییرات دما وpH جهت انجام تحقیقات تکمیلی در مدت تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلای خال‌قرمز بررسی و با پژوهش حاضر مقایسه شود.

منابع

Alavi S.M.H., Cosson J. 2005a. Sperm motility in fishes: (I) effects of temperature and pH. Cell Biology International, 29: 101-10.

Alavi S.M.H., Cosson J. 2005b. Sperm motility and fertilizing ability in the Persian sturgeon *Acipenser persicus*. Aquaculture Research, 36: 841-50.

Alavi S.M.H., Cosson J. 2006. Sperm motility in fishes: (II) Effects of ions and osmolality: a review. Cell Biology International, 30(1): 1-14.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-04-19]

Banagar G.R., Kiabi B.H., Homayoonnezhad I., Piri I., Amirian P. 2008. Biodiversity of Fish Species in Haraz River (An Ecological Approach). World Applied Sciences Journal, 5(1): 05-11.

Billard R. 1981. Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in Rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Aquaculture, 23: 287-93.

Billard R. 1983. Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the fertilisability of spermatozoa in rainbow trout *Salmo gairdneri*. Journal of Reproduction and Fertility, 68: 77-84.

Billard R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. Reproduction Nutrition Development, 2: 877-920.

Billard R., Cosson M.P. 1990. The energetics of fish sperm motility. In: Gagnon, C. (Eds.), Controls of sperm motility, biological and clinical aspects. CRC Press, Florida, pp: 153-173.

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.

Billard R., Petit J., Jalabert B., Szollosi D. 1974. Artificial insemination in trout using a sperm diluent. In: Blaxter, O.H.S. (Eds.), Symposium on the early life history of fish. Springer, Berlin, pp: 715-23.

Chao N.H., Tsai H.P., Liao I.C. 1992. Short-term and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabracius*. Asian Fisheries Science, 5: 3-16.

Coad B. 2011. Freshwater Fishes of Iran. Available at http://www.briancoad.com/contents.htm.

Coetzee K., Menkveeld R. 2001. Validation of anew disposable counting chamber. Archives of Andrology, 47: 153-156.

Cosson J. 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. Aquaculture International, 12(1): 69-85.

Cosson J., Linhart O., Mims S.D., Shelton W.L., Rodina M. 2000. Analysis ofmotility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. Journal of Fish Biology, 56: 1-20.

Fitzpatrick J.L., Henry J.C., Leily N.R., Devlin R.H. 2005. Sperm characteristics and fertilization success of masculinized Coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. Aquaculture, 249: 459-468.

Hashemzadeh Segherloo I., Farahmand H., Abdoli A., Bernatchez L., Primmer C.R., Swatdipong A., Karami M., Khalili B. 2012. Phylogenetic status of brown trout *Salmo trutta* populations in five rivers from the southern Caspian Sea and two inland lake basins, Iran: A morphogenetic approach. Journal of Fish Biology, 81(5): 1479-1500.

Hashemzadeh Segherloo H., Farahmand A., Abdoli M., Karami M., Bernatchez L. 2009. Morphological comparison of brown trout, *Salmo trutta fario*,

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-04-19]

populations of Haraz, Lighvan and Mardagh Rivers. Journal of Fisheries, Iranian Journal of the Natural Resources, 62(1): 69-80. (In Persian).

Kho K.H., Tanimoto S., Inaba K., Oka Y., Morisawa M. 2001. Transmembrane cell signaling for the initiation of trout sperm motility: roles of ionchannels and membrane hyperpolarization for cyclic AMP synthesis. Zoological Science, 18: 919-928.

Kiabi B.H., Abdoli A., Naderi M. 1999. Status of the fish fauna in the South Caspian Basin of Iran. Zoology in the Middle East, 18: 57-65.

Kjørsvik E., Mangor-Jensen A., Holmefjord I. 1990. Egg quality in fishes. In: Blaxter JHS, Southward AJ (Eds.). Advance marine biology, Academic Press, Waltham, USA, pp: 71-113.

Kottelat M., Freyhof J. 2007. Handbook of European Freshwater Fishes. Berlin and Cornol, 646 P.

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. Journal of Fish Physiology and Biochemistry, 15: 167-79.

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

Linhart O., Cosson J., Mims S.D., Rodina M., Gela D., Shelton W.L. 2003a. Effects of ions on the motility of fresh and demembranated sperm of common carp (*Cyprinus carpio*) and paddlefish (*Polyodon spathula*). Journal of Fish Physiology and Biochemistry, 28: 203-205.

Linhart O., Mims S.D., Boris Gomelsky B., Hiott A.E., Shelton W.L., Cosson J. 2003b. Ionic composition and osmolality of paddlefish (*Polyodon spathula*, Acipenseriformes) seminal fluid. Aquaculture International, 11: 357-368.

Linhart O., Rodina M., Bastl J., Cosson J. 2003c. Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca* L.). Journal of Applied Ichthyology, 19: 177-181.

Linhart O., Slechta V., Slavik T. 1991. Fish sperm composition and biochemistry. Bulletin of the Institute of Zoology Academia Sinica, 16: 285-311.

Luckenbach T., Triebskorn R., Müller E., Oberemm A. 2001. Toxicity of waters from two streams to early life stages of brown trout (*Salmo trutta f. fario* L.), tested under semi-field conditions. Chemosphere, 45(4): 571-579.

Martínez-Páramo S., Pérez-Cerezales S., Gómez-Romano F., Blanco G., Sánchez J.A., Herráez M.P. 2009. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. Theriogenology, 71: 594-604.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-04-19]

Morisawa M., Suzuki K., Shimizu H., Morisawa S., Yasuda K. 1983. Effect of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. Journal of Experimental Zoology, 107:95-103.

Moyle P.B. 2002. Inland fishes of California.1st edition. University of California press. Berkeley, London, 517 P.

Nynca J., Dietrich G.J., Dobosz S., Grudniewska J., Ciereszko A. 2014. Effect of cryopreservation on sperm motility parameters and fertilizing ability of brown trout semen. Aquaculture, 433: 62-65.

Rajabi Nejad R., Azeri Takami Gh., Ismaili Sari A., Nikooian A. 2011. The relationship between natural nutrition of *Salmo trutta fairo* with Lar Lake benthic fauna biomass density. Marine Biology, 2(8): 1-11. (In Persian).

Rideout R.M., Trippel E.A., Litvak M.K. 2004. Relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and spawning date in wild and cultured haddock. Journal of Fish Biology, 65: 319-332.

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

Saad A., Billard R. 1987. Spermatozoa production and volume of semen collected after hormonal stimulation in the carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture, 65: 67-77.

Sahinoz E., Aral F., Dogu Z. 2007. Changes in Mesopotamian spiny eel, (*Mastacembelus mastacembelus*) (Bank & Solender in Russell, 1794) (Mastacembelidae) milt quality during a spawning period. Theriogenology, 67: 848-854.

Stoss J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM(Eds.).Fish physiology, IX B. Academic Press, New York, pp. 305-350.

Talebi Darabi M., RajabiIslami H., Kamali A., Bahramian B. 2014. Effect of calcium and magnesium ions in the billard salt solution on sperm motility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum 1792). Journal of Veterinary Research, 69(3): 219-225. (In Persian).

Triebskorn M.S.E.M.R. 1998. Brown trout *Salmo trutta f. fario* liver ultrastructure as a biomarker for assessment of small stream pollution. Biomarkers, 3(2):93-108.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-04-19]

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-04-19]