Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد سیزدهم، شماره ششم، بهمن- اسفند ۱۳۸۵
www.magiran.com/jasnr
www.sid.ir

اثر رقیق‌کننده‌های مختلف بر مدت زمان تحرک اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

محمدرضا کلباسی و * رضا لرستانی

به‌ترتیب عضو هیات علمی گروه شیلات و دانشجوی کارشناسی‌ارشد شیلات دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: ۸۳/۸/۳۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۵/۸/۷

چکیده

در این تحقیق اثرات ۱۲ نوع محلول فعال کننده لقاح، مایع سلومیک بدون و حاوی خون و محلول شاهد (آب مورد استفاده در کارگاه تکثیر کلاردشت) بر مدت زمان تحرک اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان از طریق مشاهده با میکروسکوپ، بررسی شد. محلول حاوی $CaCl_2.2H_2O$ ۰/ ۷۳۵ g/l و NaCl ۷/ ۷۰۵ g/l با pH برابر۷/۷، تفاوت معنی داری در مدت زمان تحرک اسپرم (به میزان ۱/۲±۷۲/۳۳ ثانیه) نسبت به دیگر محلول‌ها و گروه شاهد (به میزان ۰/۳۳±۲۳/۳۳ ثانیه) نشان داد ($P\leq0.05$). تحرک اسپرم در حضور مایع سلومیک بدون خون (به میزان ۰/۸۸± ۵۲/۳۳ ثانیه) نسبت به مایع سلومیک حاوی خون (به میزان ۰/۸۸±۳۶/۳۳ ثانیه) بیشتر و واجد تفاوت معنی‌دار بود ($P\leq0.05$).

واژه‌های کلیدی: فعال کننده، تحرک، اسپرم، قزل آلای رنگین کمان، کلاردشت

مقدمه

یکی از عوامل مهم در فرآیند لقاح، استفاده از اسپرم مناسب است. بنابراین کیفیت اسپرم که مهم‌ترین مشخصه آن تحرک می‌باشد، می‌تواند سبب افزایش لقاح گردد (یگانه، ۱۳۸۱). از این رو، استفاده از روش‌های مناسب لقاح و نگهداری سلول‌های جنسی به‌منظور افزایش کارآیی تکثیر مصنوعی در ماهیان امری ضروری است (بیلارد و کوسون، ۱۹۹۲).

کیفیت اسپرم معمولاً بوسیله شدت تحرک، درصد اسپرم‌های متحرک و مدت زمان حرکت رو به جلو اسپرم ارزیابی می‌گردد. پارامترهای دیگری که ممکن است جهت ارزیابی کیفی اسپرم استفاده گردد، اسپرماتوکریت و ترکیبات شیمیایی پلاسمای منی می‌باشد (بیلارد، ۱۹۹۲). در این میان تحرک اسپرماتوزوییدبه‌عنوان یکی از فاکتورهای ارزیابی کیفی آن، می‌تواند نقش مهمی را در موفقیت عملیات لقاح مصنوعی ایفا نماید (بیلارد، ۱۹۸٦؛ لاهنشتینر، ۱۹۹٦). آغاز تحرک اسپرم قزل آلای رنگین کمان احتمالاً به علت تغییر در پتانسیل غشاء، بعد از رقیق‌سازی بوسیله آب شیرین و کاهش غلظت k^+ می‌باشد که بعد از آن کانال‌های Ca^{2+} باز شده و بعد از ورود یون Ca^{2+} به درون سلول،

* - مسئول مکاتبه: reza_lorestany@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

تحرک آغاز می‌گردد. مدت زمان کم تحرک اسپرم به علت مصرف سریع ذخیره ATP خارج از سلول و ناتوانی میتوکندری‌ها در برآورد نیاز انرژی تاژک می‌باشد. کاهش ATP باعث کاهش فرکانس ضربات تاژک می‌گردد (بیلارد، ۱۹۹۲). در این خصوص افزایش یون کلسیم خارج سلولی می‌تواند تحرک اسپرماتوزویید قزل آلای رنگین کمان را بهبود بخشد (کوسون و همکاران، ۱۹۸۹). تحقیقات جدید برروی مواد تناسلی ماهی کپور بخصوص اسپرم نشان داده است که استفاده از فعال کننده‌ها مانند محلول نمکی موجب حفظ ساختار تاژک اسپرم شده و در نتیجه زمان حرکت اسپرم افزایش می‌یابد. به‌همین جهت با بهبود تکنیک‌های تلقیح مصنوعی محققان به تدریج از محلول‌های فعال کننده اسپرم به جای آب در فرآیند لقاح استفاده کردند (کوسون و همکاران، ۱۹۹۹؛ احمدیان، ۱۳۸۱).

علاوه‌بر محلول‌های نمکی، ترکیبات بیولوژیک مانند مایع شکمی ماهی، مایع اسپرمی و BSA[1] به‌عنوان فعال کننده اسپرم در سال ۱۹۸۳توسط بیلارد استفاده شد و قدرت باروری اسپرماتوزویید و موفقیت لقاح آن در ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی و تحقیق قرار گرفت. بیلارد از مایع شکمی با غلظت ۱ درصد و ۰/۱ درصد برروی تخمک‌های ماهی قزل آلای رنگین کمان استفاده نمود که نتیجه حاصل افزایش زمان حرکت و در نتیجه باروری تخمک بود. تمایز جنسی و دینامیک گامتوژنز، بیولوژی و نگهداری گامت‌های تناسلی در تولید مثل ماهی قزل آلای رنگین کمان در سال ۱۹۹۲ توسط بیلارد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مدیریت تخمک و اسپرم در ماهی که شامل استفاده از فعال کننده‌ها می‌باشد، برروی کارایی لقاح در قزل آلای رنگین کمان مؤثر می‌باشد.

بررسی مقایسه‌ای تحرک اسپرم تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus* و قابلیت لقاحی آن در آب شیرین و محلول‌های نمکی در سال ۱۳۸۱ توسط علوی صورت گرفت. نتایج این تحقیق حساسیت زیستی اسپرماتوزوآی تاس ماهی ایرانی به یون‌های کلسیم، منیزیوم و فشار اسمزی را نشان می‌دهد. همچنین قابلیت لقاح اسپرم بعد از رقیق‌سازی در محلول نمکی افزایش می‌یابد.

تاکنون تحقیقی در زمینه اثر استفاده از محلول‌های فعال کننده نمکی بر مدت زمان تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در ایران صورت نگرفته است و هدف از انجام این تحقیق بررسی مدت زمان تحرک اسپرم در حضور فعال کننده‌های متفاوت به‌عنوان جایگزین آب معمولی، همچنین اثر مایع سلومیک بدون خون و حاوی خون بر مدت زمان تحرک اسپرم در ماهی قزل آلای رنگین کمان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در آبان سال ۱۳۸۳ در مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت انجام گرفت. جهت آماده‌سازی ۱۲ محلول فعال کننده مورد نظر، ترکیبات شیمیایی مربوط به هر فعال‌کننده، به دقت توزین و در بشر جداگانه‌ای ریخته شد(جدول ۱). سپس بوسیله دستگاه همزن مغناطیسی، مواد در یک لیتر از آب کارگاه کاملاً حل گردید. مواد آزمایشگاهی محلول‌های فعال کننده به دلیل ساختار نمکی آنها به راحتی در آب به‌صورت محلول در آمدند. به دنبال آن pH محلول‌ها به‌وسیله HCl و NaOH و با استفاده از دستگاه pH متر در pH مورد نظر تنظیم شد (جدول ۱). در خصوص فعال کننده‌هایی که pH آنها در منابع ذکر نشده بود، pH حاصل از حل نمودن مواد شیمیایی مربوطه در ۱ لیتر از آب کارگاه، برای آن فعال‌کننده در نظر گرفته شد (جدول ۱). مخلوط اسپرم استحصال شده از ٤ ماهی مولد نر که به یک نسبت در یک پلیت ترکیب شده بود جهت سنجش تحرک اسپرم با استفاده از فعال کننده‌های مختلف و گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفت (بیلارد، ۱۹۸۳).

1- Bovine Serum Albumin

www.SID.ir

Archive of SID

در این خصوص ۱ قطره اسپرم را روی لام در زیر میکروسکوپ قرار داده و جهت فعال‌سازی آن، یک قطره فعال کننده نمکی و یا آب کارگاه به‌عنوان گروه شاهد استفاده شد و همزمان بوسیله کورنومتر مدت زمان تحرک اسپرم ثبت گردید (آز و همکاران، ۱۹۹۱؛ لیلی و همکاران، ۲۰۰۳؛ علوی، ۱۳۸۱؛ یگانه، ۱۳۸۱). مدت زمان تحرک اسپرم تا زمانی که تحرک ۹۵ تا ۹۹ درصد سلول‌ها متوقف شوند، در نظر گرفته شد (لیلی و همکاران، ۲۰۰۳؛ بیلارد، ۱۹۸۳؛ آز و همکاران ۱۹۹۱؛ بیلارد و کوسون، ۱۹۹۹). طول مولدین نر استفاده شده در این تحقیق ۱/۲±۳٤ سانتی‌متر و وزن آنها نیز ۲۰±۹۰۰ گرم بود. میزان اسپرماتوکریت مولدین نر استفاده شده در این تحقیق ۰/۳±۲٤ بود. مدت زمان تحرک اسپرم تا زمانی که تحرک ۹۵ تا ۹۹ درصد سلول‌ها متوقف شوند، در نظر گرفته شد (بیلارد، ۱۹۸۳؛ آز و همکاران، ۱۹۹۱؛ لیلی و همکاران، ۲۰۰۲؛ احمدیان، ۱۳۸۱؛ علوی، ۱۳۸۱؛ یگانه، ۱۳۸۱). از آنجایی که دما یک فاکتور اساسی در مدت زمان تحرک اسپرم می‌باشد، (بیلارد و کوسون، ۱۹۹۲) فعال کننده‌ها نیز با آب کارگاه هم دما شدند. درجه حرارت آب کارگاه ۸ درجه سانتی‌گراد بود و بدین‌منظور فعال کننده‌ها و ۱ لیتر از آب کارگاه به‌عنوان گروه شاهد، درون ظروف یکبار مصرف قرار داده شدند و تا هم‌دما شدن آن‌ها با آب کارگاه، در آن نگهداری شدند. جهت سنجش اثر فعال‌کننده‌های متفاوت بر مدت زمان تحرک اسپرم، همانند گروه شاهد عمل شد با این تفاوت که جهت فعال‌سازی اسپرم به جای آب، از فعال کننده‌ها استفاده شد. (احمدیان، ۱۳۸۱؛ یگانه، ۱۳۸۱) و مدت زمان تحرک اسپرم هم در گروه شاهد و هم فعال کننده‌های متفاوت در ۳٦ تکرار ثبت گردید. جهت بررسی اثر مایع سلومیک بدون خون و حاوی خون بر مدت زمان تحرک اسپرم، ابتدا مایع سلومیک ٤ مولد ماده که حاوی خون بود از تخمک‌ها جدا گردید و مقداری از آن در دور ۲۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد تا خون از آن کاملاً جدا گردد. سنجش مدت زمان تحرک اسپرم در حضور مایع سلومیک بدون خون و حاوی خون نیز مانند فعال کننده‌ها صورت گرفت با این تفاوت که در این حالت جهت فعال‌سازی اسپرم یک بار از مایع سلومیک حاوی خون و بار دیگر از مایع سلومیک بدون خون استفاده شد و هر کدام با ۱۲ تکرار صورت پذیرفت.

پردازش آماری داده‌ها: اطلاعات جمع‌آوری شده از بررسی‌های آزمایشگاهی با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگراف اسمیرنف و آزمون تجزیه واریانس یک طرفه و آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۹۵ درصد تایید گردید.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس یک طرفه نشان می‌دهد که بین اثر محلول‌های متفاوت فعال‌کننده بر مدت زمان تحرک اسپرم، اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۵ درصد وجود دارد (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس مدت زمان تحرک اسپرم قزل آلا با استفاده از محلول‌های متفاوت فعال‌کننده.

منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	P
بین گروه ها	۳۱۰/۰۷٦	۱۲	۱۱٤٤/۸۹٦	۱۳۷۳۸/۷٦۹	/۰۰۰
درون گروه ها	۹٦/۰۰	۲٦	۳/٦۹۲	-	-
کل	۱۳۸۳٤/۷٦۹	۳۸	-	-	-

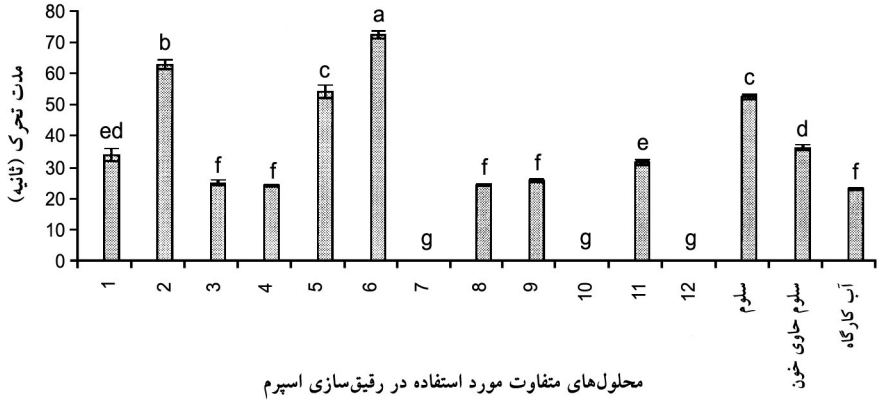
www.SID.ir

Archive of SID

براساس نتایج به‌دست آمده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، محلول فعال‌کننده ٦ با ترکیبی از $CaCl_2.2H_2O$ ۰/۷۳۵ g/l و NaCl ۷/ ۷۰۵ g/l با pH برابر۷/۷، باعث بیشترین مدت زمان تحرک اسپرم نسبت به سایر محلول‌ها و شاهد آب ($P\leq0/05$) شده است (شکل ۱). متوسط مدت زمان تحرک اسپرم در آب کارگاه ۲۳/۳۳±۰/۳۳ ثانیه ولی در محلول شماره ٦ این میزان ۷۲/۳۳±۱/۲ ثانیه می‌باشد (جدول ۳). بعد از این محلول، محلول فعال‌کننده ۲ (به میزان ٦۲/٦٦±۱/٤٥) قرار می‌گیرد که خود نیز با محلول فعال‌کننده ٦ و سایر محلول‌ها، اختلاف معنی‌داری را در سطح ۹۵ درصد نشان می‌دهد و در سطح پایین‌تر از محلول ٦ قرار می‌گیرد.

جدول ۳- گروه‌بندی محلول‌های متفاوت فعال‌کننده اسپرم قزل آلا براساس مدت زمان تحرک اسپرم برحسب (s).

گروه بندی / محلول‌ها	G	f	e	d	c	b	a
محلول۷	۰/۰۰						
محلول۱۰	۰/۰۰						
محلول۱۲	۰/۰۰						
گروه شاهد (آب)		۲۳/۳۳±./۳۳					
محلول٤		۲٤/۳۳±./۳۳					
محلول۸		۲٤/٦٦ ±./۳۳					
محلول۳		۲۵/۳۳ ±./۸۸					
محلول۹		۲٦±./۵۷					
محلول۱۱			۳۱/٦٦ ±./۸۸				
محلول۱			۳٤±۲/۰۸	۳٤±۲/۰۸			
مایع سلومیک حاوی خون				۳٦/۳۳±./۸۸			
مایع سلومیک بدون خون					۵۲/۳۳ ±۰/۸۸		
محلول۵					۵٤±۲/۰۸		
محلول۲						٦۲/٦٦ ±۱/٤۵	
محلول٦							۷۲/۳۳ ±۱/۲



شکل ۱- اثر محلول‌های متفاوت فعال‌کننده اسپرم بر مدت زمان تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلا برحسب ثانیه.

www.SID.ir

Archive of SID

محلول فعال‌کننده شماره ۵ (به میزان ۲/۰۸±۵٤/٦٦ ثانیه) و مایع سلومی بدون خون (به میزان ۰/۸۸±۵۲/۳۳ ثانیه) در یک گروه قرار می‌گیرند و با هم اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد ولی در سطح ۹۵ درصد با دیگر محلول‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند. اثر مایع سلومیک حاوی خون بر مدت زمان تحرک اسپرم اختلاف معنی‌داری را در سطح ۹۵ درصد با دیگر محلول‌ها نشان می‌دهد. محلول شماره ۱ (به میزان ۲/۰۸ ± ۳٤ ثانیه) تفاوت معنی‌داری را با محلول شماره ۱۱ (به میزان ۰/۸۸ ± ۳۱/٦٦ ثانیه) و مایع سلومیک حاوی خون (به میزان ۰/۸۸ ± ۳٦/۳۳) نشان نمی‌دهد و از لحاظ عددی حد بینابین این دو قرار می‌گیرد ولی محلول ۱۱ تفاوت معنی‌داری را با مایع سلومیک حاوی خون در سطح ۹۵ درصد نشان می‌دهد.

محلول‌های فعال کننده ۳ (به میزان ۰/۸۸±۲۵/۳۳ ثانیه)، ٤ (به میزان ۰/۳۳±۲٤/۳۳)، ۸ (به میزان ۰/۳۳±۲٤/٦٦ ثانیه)، ۹ (به میزان ۰/۵۷±۲٦ ثانیه) و گروه شاهد (آب) تفاوت معنی‌داری در مدت زمان تحرک اسپرم نسبت به یکدیگر ایجاد ننمودند و در یک گروه قرار گرفتند اما با دیگر محلول‌ها تفاوت معنی‌داری را در سطح ۹۵ درصد دارند. محلول‌های ۷، ۱۰ و ۱۲ نیز در پایین‌ترین گروه قرار گرفتند و تحرک اسپرم در حضور آنها مشاهده نگردید (جدول ۳).

بحث

ترکیبات مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در این تحقیق (جدول ۱) و مقایسه آن با جدول گروه‌بندی محلول‌ها براساس مدت زمان تحرک و تفکیک محلول‌ها در آزمون چند دامنه‌ای دانکن (جدول ۳) نشان می‌دهد که استفاده از محلول ٦ در مقایسه با سایر محلول‌ها، بیشترین مدت زمان تحرک اسپرم را در پی داشته است. همان‌طور که در (جدول ۱) به چشم می‌خورد، در ترکیب محلول ٦ حضور $CaCl_2$ به میزان ۰/۷۳۵ گرم باعث عملکرد و تأثیر مناسب این محلول در مقایسه با سایر محلول‌ها شده است زیرا یون کلسیم مهمترین فاکتور جهت القاء و تجدید مدت زمان تحرک اسپرم می‌باشد. طی مطالعاتی که روی الگوی حرکتی اسپرماتوزویید ماهیان آب شیرین صورت گرفته است، نشان داده شده که یون کلسیم در چگونگی بروز رفتار اسپرم بعد از آغاز تحرک نقش تنظیمی را ایفاء می‌نماید به‌طوری که با افزایش غلظت خارج سلولی یون کلسیم، دامنه حرکت اسپرم کاهش می‌یابد، اما مدت زمان تحرک اسپرم افزایش می‌یابد (بیلارد و کوسون، ۱۹۹۲).

اضافه نمودن یون کلسیم به محلول‌های محتوی k^+ که باعث جلوگیری از تحرک می‌شدند، فعال‌سازی سلول‌های اسپرم را به‌طور کامل و به‌طور مشابه در پی داشت اما غلظت بالای یون کلسیم در محلول‌های تقویت کننده ممکن است باعث تغییر و یا تخریب پروتئین ATP-ase که پروتئین تنظیم کننده فعالیت انرژی خواه کانال‌های یونی سدیم_ پتاسیم در سطح غشاء سیتوپلاسمی اسپرم می‌باشد، گردد و ممکن است که به کاهش لقاح تخم‌های منجر شود (علوی، ۱۳۸۱). ریچارد کریستن و همکاران (۱۹۸۷) عدم تحرک اسپرم ستاره دریایی را در حضور ۲ میلی‌مول یون کلسیم گزارش نمودند. زمانی که ۱ میلی‌مول یون کلسیم به محلول فعال‌کننده اضافه شود، تحرک اسپرم در ماهی قزل‌آلا، فراتر از ۳۰ ثانیه به طول می‌انجامد (بیلارد و کوسون، ۱۹۸۹). همان‌طوری که در شکل ۱ مشاهده می‌شود با افزایش میزان یون کلسیم مشهود است که بیشترین مدت زمان تحرک اسپرم در محلولی که بالاترین میزان یون کلسیم را در خود دارد، دیده می‌شود. البته افزایش میزان یون کلسیم باید متناسب با افزایش دیگر مواد شیمیایی نیز باشد، چون در محلول ۱۰ نیز میزان بالایی یون کلسیم وجود دارد اما چون پتاسیم آن بالا می‌باشد،

www.SID.ir

Archive of SID

عدم تحرک اسپرم در حضور آن محلول دیده می‌شود.

نتایج به‌دست آمده از محلول ٦ حاکی از تأثیر فوق العاده این یون بر مدت زمان تحرک اسپرم می‌باشد. بیلارد (۱۹۹۲) بیان نمود که در محلول ٦، ۱۰۰ درصد اسپرم‌ها در ماهی قزل آلای رنگین کمان تحرک دارند که علت آن را می‌توان تأثیر میزان یون کلسیم در این محلول دانست. نزدیک بودن شرایط pH در محلول ٦ به pH مایع منی اسپرم قزل آلا و عدم وارد شدن شوک ناشی از اختلاف pH به سلول‌های اسپرم در حضور محلول ٦ عامل دیگری در جهت تداوم بیشتر حرکت اسپرم نسبت به محلول‌های دیگر باشد.

همان‌طور که در جدول ۱ (ترکیبات محلول‌ها) مشاهده می‌گردد، محلول‌های ۱، ٤، ۹، ۱۰ و ۱۱ نیز حاوی مقادیر متفاوتی از $CaCl_2$ می‌باشند اما مقادیر یون کلسیم در آنها کمتر از فعال کننده ٦ می‌باشد.

با مشاهده جدول ۱ و مقایسه آن با شکل ۱ ملاحظه می‌شود که محلول ۱ با میزان ۰/۲ گرم $CaCl_2$ در وضعیت مناسب‌تری در مقایسه با محلول ۱۱ با ۰/۳ گرم $CaCl_2$ قرار گرفته است و این در حالی است که مجموعه‌ای از چندین عامل (فشار اسمزی، pH، یون سدیم، یون کلسیم، یون پتاسیم و ...) تعیین کننده عملکرد مناسب یک فعال کننده می‌باشد و با تغییر در میزان هر کدام تأثیر آن فعال کننده بر مدت زمان تحرک اسپرم متفاوت خواهد بود (یگانه، ۱۳۸۱). ماده شیمیایی TRIS به‌صورت ایجاد محیط قلیایی در محلول‌ها نقش خود را ایفا می‌کند و از آنجا که PHهای قلیایی تحرک بهتری را در اسپرم ایجاد می‌کنند (بیلارد و کوسون، ۱۹۹۲) پس شاید یکی از دلایل مناسب بودن این ماده شیمیایی در محلول‌های رقیق کننده بدلیل ایجاد محیط قلیایی در آنها باشد. در فعال کننده ٦ با pH= ۷/۳ و میزان ۷/۳ گرم NaCl بهترین نتیجه در القاء مدت زمان تحرک در مقایسه با دیگر محلول‌ها به‌دست آمده است و این در حالی است که فعال کننده ۱ با وجود کمتر بودن یون کلسیم در ترکیب آن نسبت به محلول ۱۱، از لحاظ میزان pH و NaCl به تقویت کننده ٦ نزدیک می‌باشد اما به هر حال فعال کننده ۱ و ۱۱ اختلاف معنی‌داری را از لحاظ آماری با هم نشان نداده‌اند.

بعد از محلول ۱۱ محلول ۹ در مقام پایین‌تری در جدول ۳ قرار می‌گیرد که علت آن را نیز شاید بتوان به دلیل کم بودن میزان یون کلسیم و یا مقدار زیادتر نمک و تفاوت شرایط اسمزی نسبت به محلول ۹ توجیه نمود. با مشاهده ترکیبات محلول ٤ دیده می‌شود که میزان یون کلسیم در این محلول بیشتر از تقویت کننده ۹ می‌باشد اما مدت زمان تحرک اسپرم در حضور این محلول کوتاه‌تر از محلول ۹ است اما تفاوت معنی‌داری بین این دو محلول از لحاظ آماری وجود ندارد.

علت کوتاه‌تر بودن مدت زمان تحرک اسپرم در محلول ٤ نسبت به محلول ۹ را شاید بتوان بدلیل وجود ۰/۲۳ گرم یون پتاسیم موجود در آن محلول و یا تغییرات فشار اسمزی دو محلول نسبت به هم عنوان کرد. البته در محلول‌های فعال کننده ترکیبی از عوامل متعدد (فشار اسمزی، PH، ترکیبات محلول و...) بر مدت زمان تحرک اسپرم تأثیر می‌گذارند که ممکن است ترکیبات محلول ٤ در مقایسه با محلول ۹ شرایطی را جهت محدود نمودن مدت زمان فعالیت اسپرم در مقایسه با محلول ۹ ایجاد نموده باشد. عدم تحرک اسپرم در حضور محلول‌های ۷، ۱۰ و ۱۲ نیز به دلیل میزان یون پتاسیم در ترکیب آن‌ها می‌باشد زیرا اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان در غلظت‌های بالای پتاسیم بی تحرک می‌باشد (کوسون و همکاران، ۱۹۹۹؛ بیلارد و کوسون، ۱۹۹۲). بنابراین، از این سه محلول بدلیل عدم تحرک اسپرم در حضور آنها، می‌توان به‌عنوان رقیق کننده در مطالعاتی از قبیل انجماد اسپرم و یا القاء ژینوژنز بهره‌برداری نمود، زیرا در مطالعات ژینوژنز جهت تابش اشعه UV و نابود ساختن خاصیت ژنتیکی در سلول‌های اسپرم نیاز به رقیق کننده‌های جهت رقیق سازی اسپرم و تابش یکنواخت اشعه به تک تک سلول‌های اسپرم در تراکم کم سلول‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشد و همچنین در سیکل انجماد اسپرم جهت حفظ سلول‌ها، باید اسپرم را در مرحله اول رقیق‌سازی نمود و بعد در، ازت مایع نگهداری کرد. با توجه به عدم تحرک اسپرم‌ها در حضور محلول‌های مزبور، جهت مطالعات ژینوژنز و سیکل انجماد اسپرم می‌توان از آنها به خوبی بهره‌برداری نمود.

بیلارد محلول شماره ۱۰ را با الهام از ترکیبات مایع منی در ماهی قزل آلا ساخت و علت عدم تحرک اسپرم با استفاده از آن را میزان پتاسیم بالای آن بیان نمود. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نیز این مطلب را تأیید می‌نماید (بیلارد، ۱۹۸۳).

بعد از محلول ٦، بهترین محلول، محلول شماره ۲ می‌باشد که ممکن است وجود ترکیبات NaCl، Glycin، Tris به‌ترتیب به مقادیر ٥/٥٤، ۳/۷۵ و ۲/٤۲ گرم و در pH=۸/٤ شرایط مساعد فشار اسمزی را نیز فراهم آورده باشد و در مقایسه با سایر محلول‌های دیگر عملکرد بهتری را نشان دهد. حرکت مستقیم و رو به جلو اسپرم زمانی که فشار اسمزی بین ۱۱ تا ۲۰۰ میلی‌اسمول بر کیلوگرم می‌باشد در حد طولانی‌ترین زمان ممکن می‌باشد (کوسون و همکاران، ۱۹۹۹).

مایع سلومیک بدون وجود خون تفاوت معنی‌داری نسبت به مایع سلومیک محتوی خون نشان داد که علت آن را شاید بتوان با دلایل زیر توجیه نمود:

اولاً وجود خون و گلبول‌های خونی به‌عنوان یک مانع فیزیکی در سر راه سلول‌های متحرک اسپرم قرار می‌گیرند و باعث هدر رفت میزان ATP آنها می‌شوند که سرانجام به کاهش مدت زمان تحرک اسپرم در مایع سلومیک حاوی خون در مقایسه با مایع سلومیک بدون خون می‌شود (مشاهدات شخصی سلول‌های اسپرم بعد از فعال‌سازی در زیر میکروسکوپ).

ثانیاً pH مایع سلومیک حاوی خون اسیدی‌تر از مایع سلومیک بدون خون می‌باشد، از آنجا که تحرک اسپرم در آزاد ماهیان شدیداً تحت تأثیر pH می‌باشد (بیلارد و کوسون، ۱۹۸٦) و pHهای قلیایی تحرک بهتری را در اسپرم قزل آلا ایجاد می‌کنند (بیلارد و کوسون، ۱۹۹۲) پس به این دلیل مایع سلومیک بدون خون تأثیر موفق‌تری را در تحرک اسپرم دارا بوده است. با مقایسه pH محلول‌های متفاوت در این تحقیق مشاهده می‌گردد که pH ۷/۷ در محلول ٦ بهترین وضعیت را در مقایسه با pH ۷/۷ آب کارگاه دارا می‌باشد، یعنی با اضافه نمودن ۷/۳۰۵ گرم NaCl و ۰/۷۳۵ $CaCl_2$ به آب کارگاه، بهترین تحرک اسپرم در مقایسه با سایر محلول‌های فعال‌کننده حاصل آمده است. از آنجا که pH مایع منی معمولاً بالاتر از ۷/۵ است همچنین pH مایع سلومیک نیز ۸/۲۵ تا ۸/٦۵ می‌باشد (بیلارد و کوسون، ۱۹۹۲) با مقایسه pH محلول‌های تقویت‌کننده ٦ و ۲ با pH مایع منی و مایع سلومیک مشاهده می‌گردد که pH تقویت کننده ٦ در حدود pH مایع منی بوده و pH فعال کننده ۲ نیز برابر با pH مایع سلومیک می‌باشد، پس عملکرد مناسب این دو محلول در مقایسه با گروه شاهد در تحرک اسپرم دور از انتظار نمی‌باشد زیرا این دو محلول علاوه‌بر داشتن pH مناسب، حاوی یون کلسیم و یون سدیم می‌باشند. یون‌های سدیم و کلسیم می‌توانند عمل جلوگیری کننده پتاسیم را در مایع منی برروی تحرک اسپرم با خنثی‌سازی اثر یون پتاسیم کاهش دهند (لینهارت، ۱۹۹۱؛ استوس، ۱۹۸۳) در این میان خنثی‌سازی اثر جلوگیری کننده پتاسیم برای یون‌های دو ظرفیتی مانند کلیسم شدیدتر می‌باشد بنابراین ممکن است که به همین دلیل عملکرد فعال کننده ٦ در مقایسه با فعال کننده ۲ بهتر بوده باشد. نزدیک بودن pH فعال کننده ٦ به pH مایع منی مزیت دیگری نیز دارد و آن وارد نشدن شوک اختلاف pH تقویت کننده و مایع منی به سلول‌های اسپرم می‌باشد، حال آنکه در سایر فعال کننده‌هایی که pH آنها از میزان pH مایع منی فاصله دارد، کوتاه‌تر شدن مدت زمان تحرک اسپرم در حضور آنها نیز مشاهده می‌گردد.

در جمع‌بندی نهایی صرف‌نظر از ترکیبات شماره ۷، ۱۰ و ۱۲ که موجب عدم تحرک اسپرم گردیده و به‌عنوان رقیق کننده مطرح می‌باشند به‌طور متوسط سایر

www.SID.ir

Archive of SID

محلول‌های فعال کننده در مقایسه با آب معمولی کارگاه کلاردشت میزان تحرک اسپرم را از حدود ۰/۳۳ ± ۲۳/۳۳ ثانیه به حدود ٤۳/۳٦ ثانیه که میانگین تمام محلول‌های فعال کننده مورد آزمایش می‌باشد، افزایش داده و در میان آن‌ها محلول شماره ٦ با ۱/۲± ۷۲/۳۳ ثانیه تحرک اسپرم، از بیشترین کارایی برخوردار بوده و قابل توصیه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

مهندس پاشا زانوسی ریاست کارگاه تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر به خاطر فراهم نمودن بستری مناسب جهت انجام تحقیق حاضر تشکر به‌عمل می‌آید.

منابع

۱.احمدی، م. ر. ۱۳۷۱. اصول تکثیر و پرروش ماهی، دانشکده دامپزشکی، ٥٤ ص.

۲.احمدیان، ن. مجازی امیری، ب. ابطحی، ب. نظری، ر. م. ۱۳۸۱. استفاده از تقویت‌کننده‌های اسپرم در لقاح تخمک تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus*، دومین همایش ملی منطقه‌ای ماهیان خاویاری، ص۱۱۱– ۱۱۵.

۳.آذری‌تاکامی، ق.، فرحمند، ح. و کمانگر، ب. ۱۳۸۰. ایجاد ماده زایی در ماهی قزل آلای رنگین کمان توسط پرتو فرابنفش، مجله منابع طبیعی ایران، جلد ٥٤، شماره ٤، ص۳٦۹–۳۸۱.

٤.علوی، س.م.ه. ۱۳۷۹. مطالعه تطبیقی مدت زمان تحرک اسپرم تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus* در آب سالن انکوباسیون و محلول‌های تقویت‌کننده، پروژه کارشناسی، کرج، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۵۰ ص.

۵.علوی، س.م.هـ ۱۳۸۱. بررسی مقایسه‌ای تحرک اسپرم تاس‌ماهی ایرانی و قابلیت لقاحی آن در آب شیرین و محلول‌های نمکی، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، دانشکده منابع طبیعی کرج، ۱۰۵ ص.

٦.یگانه، س. ۱۳۸۱. اثر تقویت‌کننده‌ها برروی مدت تحرک اسپرم و توان لقاح در کفال خاکستری *Mugil cephalus*، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، کرج: دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۱۱۲ص.

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

8.Billard, R. 1983. Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the Rainbow trout, *Salmo gairdneri* J. Repro. Fert., 68: 77-84.

9.Billard, R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. Reprod. Nutr. Develop. 26 (4): 877-920.

10.Billard, R. 1990. Culture of salmonids in fresh water. Aquaculture, Vl 2: 549-592

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

12.Billard, R., and Cosson, M.P. 1986. Sperm motility in rainbow trout, *Parasalmo gairdneri*; Effects of pH and temperature In: Reproduction in fish basic and applied aspects in endocrinology and genetics. Breton B. and Zohar Y., (eds). INRA, Paris, pp: 161-167

13.Billard, R., and Cosson, M.P. 1989. Measurement of sperm motility in trout and carp. Aquaculture, a biotechnology in progress. N. Depaun, E. Jaspers, Ackefors H. and Wilkins, N. (Eds). European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, pp: 499-503

14.Billard, R., and Cosson, M.P. 1989. Measurement of sperm motility in trout and carp. Aquaculture, a biotechnology in progress. N. Depaun, E. Jaspers, Ackefors H. and Wilkins, N. (Eds). European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, pp: 499-503

15.Billard, R., and Cosson, M.P. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. J. of Exp. Zool., 261: 122-131

16.Billard, R., Petit, J., Jalabert, B., and Szoilosi, D. 1974. Artificial insemination in trout using a sperm diluent. Pages 715-723 in J. H. S. Blaxter, editor. Early life history of fish. Springer-Verlag, Berlin.

17.Christen, R., Gatti, J.L., and Billard, R. 1987. Trout sperm motility. Eur. J. Biochem. 166, PP: 667-671.

www.SID.ir

Archive of SID

18.Cosson, J., Billard, R., Gibert, C., Dreanno, C., and Suquet, M. 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In the male gamete. From basic to clinical application, C. Gagnon, (Ed). Cache Rive Press: 161-186
19.Cosson, M.P., Billard, R., and Letellier, L. 1989. Rise of internal Ca^{+2} accompanies the initiation of trout sperm motility. Cell motility and cytoskeleton, 14: 424-434.
20.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. J. Fish Physiol. and Biochem. 15: 167-179.
21.Liley, N.R., Tamkee, P., Tsai, R., and Hoysak, D.J. 2002. Fertilization dynamics in Rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)*: Effect of male age, social experience, and sperm concentration and motility on invitro fertilization. Can.J. fish. Aquat. Sci. 59: 144-152.
22.Linhart, O., Slechta, V., and Slavik, T. 1991. Fish sperm composition and biochemistry. Bulletin of insitute of Zoology. Academia Sinica. Monograph. 16: 258-311
23.Santhanam, R., Sukumaran, N., Natarajan, P. 1990. A manual of fresh-water aquaculture. PP: 95-101.
24.Stoss, J., 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson (Editors), Fish Physiology, Vol. IXB., Academic press, London, PP. 305-350.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 13(6), Feb-Mar 2007
www.magiran.com/jasnr
www.sid.ir

Effect of different diluent solutions on the duration of sperm motility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

M.R. Kalbassi and R. Lorestani
Faculty member of Fisheries and M.Sc. student Respectively, Dept. of Tarbiat Modarres Univ., Iran

Abstract

Effects of 12-fertilizer solution as well as coelumic fluid with and without blood content in comparison of used water in kelardasht center have been investigated by microscope on motility duration of rainbow trout sperm. Final results show that solution No. 6 with content of NaCl 7.305g/l, $CaCl_2.2H_2O$ 0.735g/l, and pH: 7.7 had significant difference on duration of motility, in compare to the other solution ($p \geq 0.05$). In this respect the mean sperm motility time were 23.33±0.33 and 72.33±1.2 seconds for water and NO.6 solution respectively. Duration of motility in coelumic fluid without blood was higher (52.33±0.88 second) and had significant difference in compare of coelumic fluid with blood (36.33±0.88 second) ($p \geq 0.05$).

Keywords: Diluent; Motility; Sperm; *Oncorhynchus mykiss*; Kelardasht

www.SID.ir