اثر تقویت کننده‌های اسپرم بر روی مدت تحرک اسپرم در ماهی کفال خاکستری *Mugil cephalus* L.[1]

سکینه یگانه[2] باقر مجازی امیری[3] مهدی یوسفیان[4] محمد علی نعمت اللهی[5]

چکیده

در این تحقیق اثر تقویت کننده‌های مختلف بر روی مدت تحرک اسپرم کفال خاکستری ***Mugil cephalus*** از اوایل آبان تا اواخر بهمن ۱۳۸۰ و ۱۳۸۱ در ٤ مولـد مورد بررسی قرار گرفت. تقویت کننده‌های مورد استفاده در این مطالعه شامل ۱۵ محلول زیر بوده‌اند: مایع سلومی (مایع شکمی) ماهی مورد مطالعه بدون رقیق‌کردن(غلظت کامل مایع سلومی) و با غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ درصد (در آب مقطر)؛ آلبومین سرم گاوی با غلظت‌های ۱۰ mg/ml و ۳۰ mg/ml (در آب مقطر)، تقویت کننده نمکی با ترکیب pH_8، ۲/۵ mMTris، ۱۹ mMGlycin، ۵ mMKCl، ٤۵ mMNaCl، تقویت کننده نمکی با ترکیب $pH_{7/5}$، ۳/٤ $mMCaCl_2$، ۰/۲ mMTris، ۳/۱ mMKCl، ۵۰۰ mMNaCl، محلول ۵۰mMNaCl و ۲۵۰mMNaCl که پس از سانتریفوژ منی و خارج‌کردن مایع اسپرمی جایگزین آن گردیده و مایعات لقاح با شوری ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۲ در هزار(تیمار شاهد) بوده است. مدت تحرک اسپرماتوزوآ در تقویت‌کننده‌های مورد نظر دامنه وسیعی داشت به گونه‌ای که مایع سلومی با غلظت‌های مختلف، بر روی تحرک اسپرماتوزوآی کفـال خاکستری ***M. cephalus*** اثر بازدارنده داشت. اسپرماتوزوآ در آلبومین سرم گاوی با دو غلظت ذکرشده، تقویت کننده نمکی (pH_8، ۲/۵ mMTris، ۱۹ mMGlycin، ۵ mMKCl، ٤۵ mMNaCl)، محلول نمک طعام با غلظت‌های۵۰mMNaCl و ۲۵۰mMNaCl (که پس از سانتریفوژ منی، جایگزین مایع اسپرمی گردید) و مایع لقاح با شوری ۱۰ در هزار غیرفعال بود، در حالیکه میانگین مدت تحرک اسپرماتوزوآ در تقویت کننده نمکی ($pH_{7/5}$، $mMCaCl_2$ ،۳/٤ mMTris، ۰/۲ mMKCl، ۳/۱ mMNaCl، ۵۰۰)، ۱٤۹/۳-۷۷/٦ ثانیه، در مایع لقاح با شوری ۱۵ در هزار، ٦۸/٦-۲٦/٦٦ ثانیه، در مایع لقـاح با شـوری ۲۰ در هزار، ۱۳۲/۳-٤۳/۳۳ ثانیه، در مایع لقـاح با شوری ۲۵ در هزار، ۱۳۵/۳-۵۹ ثانیـه و در مایع لقاح با شوری ۳۲ در هزار (شـاهد)، ۱۳۸-۷۳/۳۳ ثانیه متغیر بود. بیشترین مدت تحرک در تقویت‌کننده نمکی ($pH_{7/5}$ $mMCaCl_2$ ۳/٤ mMTris، ۰/۲ mMKCl، ۳/۱ mMNaCl، ۵۰۰) بود. با توجه به تحقیـق انجام شده می‌توان بیان کرد که اسپرماتوزوآی کفـال خاکستری ***M. cephalus*** در محلـــول‌هایی با فشاراسمزی بالا فعال می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *تقویت کننده، تحرک اسپرم، کفال خاکستری، مایع سلومی، لقاح.*

---

[1] - تاریخ دریافت: ۸۲/۶/۲۵ تاریخ پذیرش: ۸۳/۳/۲۵

[2] - دانش آموخته شیلات دانشگاه تهران و دانشجوی دکتری شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(E-mail:skyeganeh@yahoo.com)

[3] - دانشیار دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران

[4] - استادیار پژوهشی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری

[5] - مربی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران

مقدمه

یکی از خانواده‌های مورد توجه در صنعت آبزی پروری دنیا، کفال ماهیان هستند که ویژگی‌هایی چون پراکنش وسیع جغرافیایی (در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری)، تحمل در برابر دامنه وسیع شوری، دما و تغذیه از پوده‌ها[1] (۱۴)، آن‌ها را از سایر ماهیان متمایز می‌سازد. به همین دلیل در بسیاری از کشورها که این ماهی را به صورت بومی در اختیار دارند، از گونه‌های اصلی پرورشی در آب‌های لب شور محسوب می‌گردند.

سه گونه ماهی کفال *M. auratus, M. saliens ,M. cephalus* در سال‌های ۱۳۱۴-۱۳۱۰ هجری شمسی از دریای سیاه به دریای خزر معرفی شدند. در جریان این پیوند گونه‌های *M. auratus ,M. saliens* به خوبی با شرایط دریای خزر سازگار شدند اما *M. cephalus* از بین رفت که دلیل آن کاملاً مشخص نگردید. پس از این اتفاق، در سال ۱۳۷۳، ایران اقدام به ورود ۲۰۰۰۰ بچه‌ماهی کفال خاکستری *M. cephalus,* با طول متوسط ۲/۵ سانتیمتر از هنگ کنگ نمود. هدف این کار، توسعه مولدین و تأمین تخم‌هایی از طریق مولدین القاء شده در شرایط اسارت بود. بعد از انتقال و سازگارکردن بچه‌ماهیان واردشده، تنها ۶۰۰۰ بچه‌ماهی باقی ماندند که پس از رسیدن آنها به بلوغ جنسی، تلاش زیادی در جهت تکثیر مصنوعی آنها صورت گرفت، اما متاسفانه تا سال ۱۳۸۰ تکثیر مصنوعی این گونه ناموفق بود و علت عدم موفقیت تکثیر مشخص نبود (۱۵).

اگرچه مطالعات نسبتاً خوبی در مورد تخمک (۲) و القاء تکثیر (۱۵) کفال خاکستری *M. cephalus*, صورت پذیرفت ولی در مورد جنس نر و اسپرماتوزوآی آن تحقیقی انجام نشده بود. با توجه به این‌که یکی از عوامل مؤثر در فرایند لقاح، اسپرم بوده و کیفیت مناسب اسپرم که مهم‌ترین مشخصه آن، تحرک می‌باشد، از مهم‌ترین فاکتورهای افزایش لقاح است، بنابراین با استفاده از تقویت‌کننده‌هایی با ترکیبات و شوری‌های مختلف، سعی شد که اثر آن‌ها بر روی مدت تحرک اسپرماتوزوآی کفال خاکستری *M. cephalus*, مطالعه شود.

مایع سلومی در ماهیان مختلف اثرات متفاوتی بر تحرک اسپرم و در نتیجه لقاح دارد که با رقیق‌سازی و یا جداکردن آن می‌توان تاثیر آن را کاهش و یا افزایش داد. اغلب مطالعات انجام‌شده در جهان در مورد اثر تقویت‌کننده‌های مختلف بر روی تحرک اسپرم است و ارتباط بین تحرک تعیین‌شده در زیر میکروسکوپ و توانایی لقاح مشخص نیست (۵)، اما به‌کارگیری رقیق‌کننده‌های مختلف با تاثیر بر فرکانس ضربان تاژک می‌تواند در توانایی لقاح مؤثر باشد به گونه‌ای که کاهش فرکانس ضربان تاژک در کپور و قزل آلا با کاهش ظرفیت لقاح همراه است (۷). بدیهی است که اسپرماتوزوآی غیر متحرک توانایی رسیدن به میکروپیل و در نتیجه لقاح تخم را نخواهد داشت. در ایران تحقیق جامعی با درنظرگرفتن مدت تحرک اسپرماتوزوآ و تاثیر آن بر روی لقاح انجام نشده است. مطالعه‌ای در مورد اثر برخی از محلول‌های تقویت‌کننده بر روی تحرک اسپرماتوزوآی تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus*, (۳) و بررسی دیگری در مورد تاثیر محلول‌های تقویت‌کننده بر لقاح این گونه (۱) صورت گرفته است.

این مطالعه برای اولین بار در ایران، به این علت صورت پذیرفت که از یک سو با تعیین اثر برخی از محلول‌های تقویت‌کننده (مایعات لقاح با شوری‌های مختلف)، علت عدم موفقیت لقاح کفال خاکستری از این جنبه مورد بررسی قرار گیرد و از سوی دیگر با یافتن محلول‌های تقویت کننده مناسب‌تر، از آنها در جهت تقویت تکثیر مصنوعی کفال خاکستری استفاده شود.

---

[1]-Detritus

مواد و روش‌ها

این مطالعه در سال‌های ۱۳۸۰ و ۱۳۸۱ در طول فصل تکثیر ماهی کفال خاکستری *M. cephalus*, (از اوایل آبان تا اواخر بهمن) در مزرعه ماهی گمیشان که در شمال شرقی دریاچه خزر قرار دارد انجام شد.

ماهی‌های مولد نر ۸-۷ ساله با میانگین طولی ۰/۸۶۶ ± ۴۴/۵[1] سانتیمتر و میانگین وزنی ۱۶/۲ ± ۹۵۵ گرم که مراحل رسیدگی جنسی خود را طی کرده و منی آن‌ها با فشار اندکی به شکم خارج می‌شد، انتخاب و در محلول MS_{222}(۸۰ppm) آرام گردیدند. سپس مقداری از منی هر یک از مولدین با استفاده از سوند به گونه‌ای که هیچ گونه تماسی با بدن خیس ماهی نیابد، خارج گردید. از نمونه منی استحصال شده(۱cc-۰/۵)، قطره‌ای بر روی لام ریخته و با اضافه‌کردن یک قطره محلول تقویت‌کننده بر روی آن مدت تحرک اسپرم از آغاز تا پایان حرکت (بی‌حرکت‌شدن کلی اسپرم‌ها) در یک زمینه میکروسکوپی در نور کم، با استفاده از کرونومتر اندازه‌گیری شد.

محلول‌هایی که برای تقویت تحرک اسپرم کفال خاکستری استفاده گردیدند، شامل: مایع سلومی بدون رقیق‌کردن (غلظت کامل مایع سلومی، CF_0)، مایع سلومی با غلظت ۰/۱، ۱ و ۱۰ درصد در آب مقطر (CF_1, CF_2, CF_3 به‌ترتیب) (برای تأمین مایع سلومی، تخمک‌ها بر روی تنظیف توری ریخته شد، مایع سلومی جمع‌آوری و سپس در غلظت‌های مورد نظر در آب مقطر تهیه شد.) آلبومین سرم گاوی با غلظت۱۰ mg/ml (BSA_1) و ۳۰ mg/ml (BSA_2) (در آب مقطر)، تقویت‌کننده نمکی با ترکیب ۲/۵ mMTris, ۱۹ mMGlycin pH_8 ۴۵ mMNaCl, ۵mMKCl, (Se_1) و با ترکیب $pH_{7/5}$ ۳/۱ mMKCl, ۰/۲ mMTris, ۳/۴ $mMCaCl_2$ ۵۰۰ mMNaCl, (Se_2)، محلول ۵۰mMNaCl (N_1) و محلول ۲۵۰mMNaCl (N_2) که هر کدام از این دو محلول (N_2 و N_1) پس از سانتریفوژکردن منی و خروج مایع اسپرمی جایگزین آن گردید. (سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد)، مایعات لقاح با شوری ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۲ در هزار (تیمار شاهد) (Fl_1, Fl_2, Fl_3, Fl_4, Fl_5 به ترتیب) بوده است. جهت تامین مایعات لقاح با شوری‌های مختلف از آب دریاچه خزر با شوری ۱۳ در هزار و NaCl لازم استفاده شد.

در این تحقیق منی از چهار مولد خارج و مدت تحرک اسپرماتوزوآ در ۱۵ تیمار مورد نظر، هر کدام با سه تکرار در مورد منی هر مولد با روش بیان‌شده اندازه‌گیری شد. برای آنالیز آماری داده‌های مربوط به مدت تحرک اسپرماتوزوآ و مقایسه بین تقویت‌کننده‌ها، مولدها و تکرارها (بین گروه‌ها) از آنالیز واریانس و برای مقایسه تک تک محلول‌ها با هم از آزمون دانکن استفاده شد. در تمام موارد سطح معنی‌دار آزمون‌ها $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

میانگین مدت تحرک اسپرماتوزوآ در مایع سلومی بدون رقیق‌کردن (CF_0) و در غلظت‌های مختلف(۰/۱=CF_1 درصد، ۱=CF_2 درصد، ۱۰=CF_3 درصد) در مورد منی استحصال شده از تمام مولدها صفر و در تیمار شاهد (مایع لقاح با شوری ۳۲ در هزار= $F1_5$) در مولدهای مختلف به ترتیب ۱/۱۵ ± ۱۳۸، ۱/۲ ± ۱۸۱/۶۷، ۳/۵۱ ± ۷۷، ۳/۲۸ ± ۷۳/۳۳ ثانیه متغیر بود (شکل۱). آنالیز آماری نشان داد که مایع سلومی بدون رقیق‌کردن و با غلظت‌های مختلف (۰/۱، ۱ و۱۰ درصد) با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵$).

میانگین مدت تحرک اسپرماتوزوآی کفال خاکستری در تقویت‌کننده پروتیینی آلبومین سرم گاوی با غلظت‌های ۱۰mg/ml و ۳۰mg/ml (BSA_1, BSA_2) در آب مقطر در تمام نمونه‌ها صفر بود (شکل۲). آزمون

[1]-مقادیر داده شده =SEM ± میانگین

دانکن نشان داد که تقویت‌کننده پروتیینی آلبومین سرم گاوی (BSA) با دو غلظت ذکرشده با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (P <۰/۰۵).

میانگین مدت تحرک اسپرماتوزوآ در تقویت‌کننده نمکی اول (Se_1) در مورد نمونه‌های مورد نظر صفر و در تقویت‌کننده نمکی دوم (Se_2) در مولدهای مختلف به‌ترتیب ۶/۰۶ ± ۱۴۹/۳۳، ۲/۳۳ ± ۱۸۳/۳۳، ۳/۲۱ ± ۸۶، ۱/۴۵ ± ۷۷/۶۶ ثانیه بود (شکل۳). تقویت‌کننده نمکی اول که اسپرم در آن تحرک نداشت با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (P <۰/۰۵)، امّا تقویت‌کنندهٔ نمکی دوم با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵)، اگر چه مدت تحرک اسپرماتوزوآ در تقویت‌کننده نمکی دوم بیشتر از تیمار شاهد بود.

میانگین مدت تحرک اسپرماتوزوآی کفال خاکستری در دو محلول ۵۰mMNaCl و ۲۵۰ mMNaCl (N_1,N_2) که پس از سانتریفوژ منی جایگزین مایع اسپرمی گردید، در تمام مولدها صفر بود (شکل۴). آزمون دانکن نشان داد که هر دو محلول بیان شده با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند (P <۰/۰۵).

اثر مایعات لقاح با شوری‌های ۱۰ (Fl_1)، ۱۵ (Fl_2)، ۲۰ (Fl_3) و ۲۵ (Fl_4) در هزار بر روی مدت تحرک اسپرماتوزوآ در شکل (۵) آورده شده است. میانگین مدت تحرک اسپرماتوزوآ در مایع لقاح با شوری ۱۰ در هزار در تمام نمونه‌های مورد نظر صفر، در مایع لقاح با شوری ۱۵ در هزار در مولدهای مختلف به‌ترتیب ۳/۷۵ ± ۶۸/۶۶، ۱/۳۳ ± ۷۱/۳۳، ۳/۶ ± ۳۰، ۴/۴ ± ۲۶/۶۶ ثانیه، در مایع لقاح با شوری ۲۰ در هزار به‌ترتیب ۱/۴۵ ± ۱۳۲/۳۳، ۳/۳۳ ± ۱۶۸/۳۳، ۱/۴۵ ± ۴۷/۶۶، ۲/۴ ± ۴۳/۳۳ ثانیه، در مایع لقاح با شوری ۲۵ در هزار به ترتیب ۲/۹ ± ۱۳۵/۳۳، ۰/۳۳ ± ۱۷۶/۶۷، ۱/۴۵ ± ۶۲/۳۳، ۲/۶۴ ± ۵۹ ثانیه اندازه‌گیری شد. مشخص شد که مایع لقاح با شوری ۱۰ و ۱۵ در هزار با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (P <۰/۰۵)، مایعات لقاح با شوری ۲۰ و ۲۵ در هزار با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند (P> ۰/۰۵).

مدت تحرک اسپرماتوزوآ در تقویت کننده‌های مورد استفاده به ترتیب زیر بود:

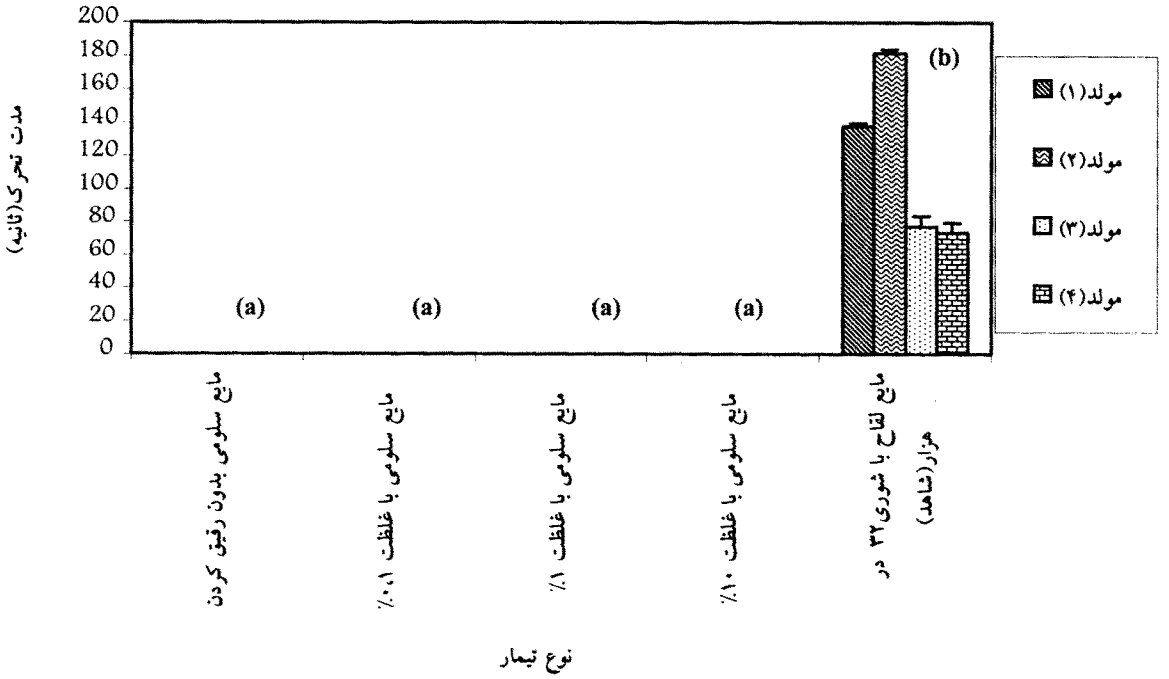
$Se_2 > Fl_5 > Fl_4 > Fl_3 > Fl_2 > Fl_1 = N_1 = N_2 = CF_0 = CF_1 = CF_2 = CF_3 = BSA_1 = BSA_2 = Se_1$

بحث و نتیجه گیری

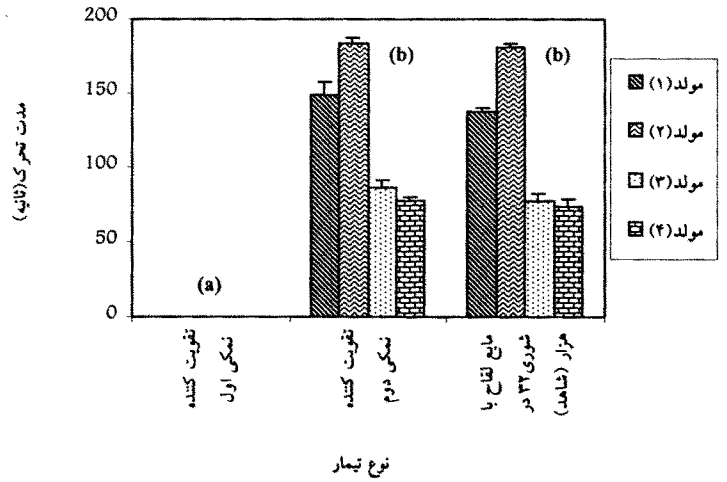
اسپرماتوزوآی ماهیان در بیضه‌ها و در برخی از گونه‌ها در مایع منی[1] غیرمتحرک است. عدم تحرک اسپرماتوزوآ در مایع منی به علت وجود یون پتاسیم (K^+) در ماهی قزل آلا (۱۳) و ماهیان خاویاری (۱۶) و یا به دلیل فشاراسمزی در ماهیان دیگر مانند کپور ماهیان می‌باشد (۱۳). اما با قرارگرفتن اسپرم در یک محیط رقیق‌تر و یا غلیظ‌تر (بسته به گونه ماهی) تحرک آغاز گشته و پس از مدتی به اتمام می‌رسد که در زمان تحرک، امکان رسیدن اسپرم به تخمک و انجام لقاح وجود دارد. بنابراین هر چه این مدت بیشتر باشد، توان لقاح افزایش خواهد یافت. عوامل مؤثر در تحرک اسپرماتوزوآی ماهیان مختلف، متفاوت می‌باشد اما به طور کلی عواملی نظیر یون‌ها (کلسیم، منیزیم و سدیم)، فشاراسمزی، pH، ATP، پروتیین‌ها و ... می‌توانند در تحرک اسپرماتوزوآی گونه‌های مختلف ماهیان مؤثر باشند.

نتایج حاصله از این تحقیق نشان داد که مایع سلومی بر روی تحرک اسپرماتوزوآی کفال خاکستری *M. cephalus*، اثر بازدارنده دارد. رقیق‌سازی مایع سلومی در نسبت‌های مختلف در آب مقطر نیز تأثیری در تحرک اسپرم نداشت (در چهار نمونه از چهار مولد و هر کدام سه تکرار). زیرا اسپزماتوزوآی این ماهی در آب مقطر فعال نمی‌شود و آب مقطر نمی‌تواند اثر بازدارنده مایع سلومی را

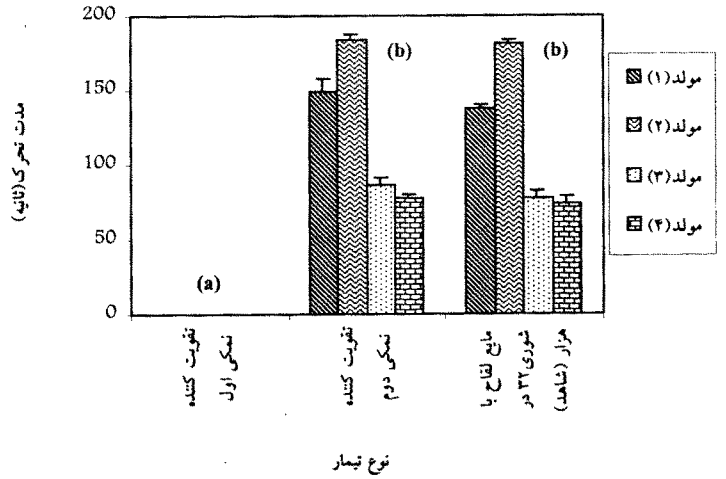
[1]-Seminal fluid



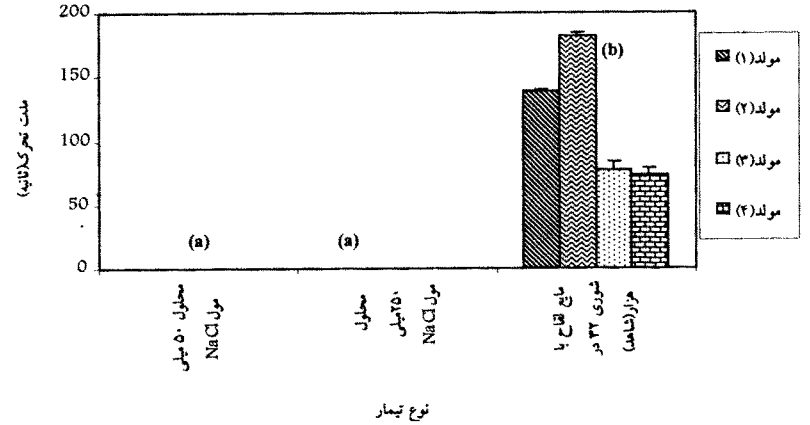
شکل۱- میانگین مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآی کفال خاکستری در مایع سلومی باغلظتهای مختلف (۰/۰۰۱٪،۰/۱٪،۱٪،۱۰٪)وتیمار شاهد(۳۲ در هزار) در مولدین مورد مطالعه حروف نامشابه نشان می دهند که تیمارها با هم، اختلاف معنی داری دارند($P < 0/05$)



شکل ۲- میانگین مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآی کفال خاکستری در آلبومین سرم گاوی (۱۰و ۳۰ میلی گرم در میلی لیتر) وتیمار شاهد(۳۲ در هزار) در مولدین مورد مطالعه حروف نامشابه نشان می دهند که تیمارها با هم اختلاف معنی داری دارند($P < 0/05$)



شکل ۳- میانگین مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآی کفال خاکستری در تقویت کننده های نمکی اول ، دوم و تیمار شاهد(۳۲ در هزار) در مولدین مورد مطالعه حروف نامشابه نشان می دهند که تیمارها با هم اختلاف معنی داری دارند(P ‹۰/۰۵)



شکل ٤- میانگین مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآی کفال خاکستری در محلولهای ۵۰ و ۲۵۰ میلی مول NaCl و تیمار شاهد(۳۲ در هزار) در مولدین مورد مطالعه حروف نامشابه نشان می دهند که تیمارها با هم اختلاف معنی داری دارند(P ‹۰/۰۵)

از بین برده و سبب تحرک اسپرماتوزوآ گردد. عدم تحرک اسپرماتوزوآی کفال خاکستری در مایع سلومی ممکن است به دلیل پایین بودن فشاراسمزی آن باشد، زیرا اسپرماتوزوآی ماهیان آب شور در محیط هیپراسموتیک فعال می‌شوند (۱۱). اسپرماتوزوآی *M. capito*، نیز در مایع سلومی غیرفعال است و زمانی که در آب دریا رقیق می‌شود در کمتر از ۸ ثانیه فعال می‌گردد (۹). اسپرماتوزوآی ماهیان خاویاری هم در مایع سلومی بی‌حرکت است (۸). برخلاف موارد ذکرشده، در قزل آلای رنگین کمان، مایع سلومی سبب تحرک اسپرماتوزوآی آن شده و افزایش نسبت رقیق‌سازی مایع سلومی سبب کاهش لقاح می‌گردد. اثر مایع سلومی در این ماهی ممکن است در نتیجه مقدار زیاد پروتیین موجود در آن باشد که تا mg/ml ۲۰ می‌رسد (۴).

آلبومین سرم گاوی (BSA) با دو غلظت mg/ml ۱۰ و mg/ml ۳۰ (در آب مقطر) در تحرک اسپرماتوزوآی کفال خاکستری *M. cephalus* ، اثری نداشت، به نظر می‌رسد ماهیت پروتیینی این تقویت‌کننده با منی کفال خاکستری سازگاری نداشته و در نتیجه اثری در تحرک اسپرماتوزوآ ندارد. در تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus*، آلبومین سرم گاوی سبب افزایش لقاح می‌گردد (۱) و دلیل آن ممکن است عمل پروتیین موجود در رقیق‌کننده‌های بیولوژیک در ترکیب با یون‌ها باشد، در نتیجه به نظر می‌رسد که اثر بازدارنده یون K^+ (عامل بازدارنده تحرک اسپرم در تاسماهیان) با رقیق‌سازی در تقویت‌کننده پروتیینی (آلبومین سرم گاوی) از بین رفته و حرکت اسپرماتوزوآ ایجاد می‌شود (۱). در قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*، نیز افزودن آلبومین سرم گاوی با غلظت mg/ml ۱۰ به تقویت‌کننده سبب بقای طولانی‌تر اسپرم رقیق‌شده می‌گردد، زیرا احتمالاً بعضی مواد مانند پروتیین‌ها در حفاظت گامت نقش دارند (۴).

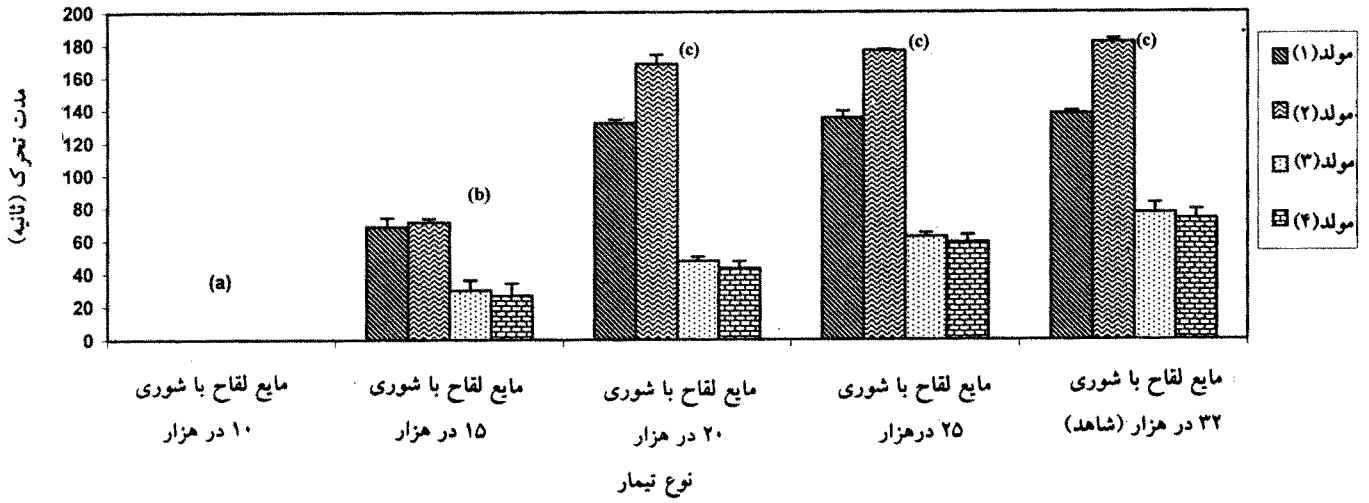
تقویت‌کننده نمکی pH_8، mMGlycin ۱۹، mMNaCl, ۵ mMKCl, ۲/۵ mMTris, ۴۵ اثری بر تحرک اسپرماتوزوآی کفال خاکستری *M. cephalus*، نداشت، پایین بودن فشاراسمزی این محلول عامل عدم تحرک اسپرماتوزوآ در آن می‌باشد. اما در تاس‌ماهی ایرانی *A. persicus*، استفاده از تقویت‌کننده نمکی با همین ترکیب سبب افزایش لقاح نسبت به آب معمولی (تیمار شاهد) می‌گردد (۱). حضور یون‌های لازم و کنترل فشاراسمزی سبب افزایش تحرک اسپرماتوزوآ به مدت چند دقیقه شده و از تغییرات مورفولوژیک آن جلوگیری می‌کند چنانچه ساختار تاژک‌های اسپرم نامنظم نشده و اسپرماتوزوآها دوام و بقای بیشتری نشان می‌دهند (۶).

در تقویت کننده نمکی $pH_{7/5}$، $mMCaCl_2$ ۳/۴، mMNaCl, ۳/۱ mMKCl, ۰/۲ mMTris, ۵۰۰ مدت تحرک اسپرماتوزوآ بیشتر از سایر تقویت‌کننده‌های مورد استفاده بود که این هم به دلیل بالا بودن فشاراسمزی این تقویت‌کننده می‌باشد.

اسپرماتوزوآی کفال خاکستری *M. cephalus*، در محلول mMNaCl ۵۰ و mMNaCl ۲۵۰ (که پس از سانتریفوژ منی و خارج کردن مایع اسپرمی، جایگزین آن گردید) تحرک نداشت. این مسئله می‌تواند به دلیل فشاراسمزی پایین محلول‌های ذکرشده باشد.

اسپرماتوزوآی این ماهی در مایع لقاح با شوری ۱۰ در هزار غیرفعال است و در مایعات لقاح با شوری‌های ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۲ در هزار (تیمار شاهد) مدت تحرک اسپرماتوزوآ با افزایش شوری، افزایش می‌یابد.

محققین معتقدند که اسپرماتوزوآی کفال خاکستری *M. cephalus*، در محلول‌هایی با فشاراسمزی کمتر از mOsm/Kg ۴۰۰ فعال نمی‌شود. این فشاراسمزی معادل شوری ۱۳/۸ در هزار می‌باشد و فعالیت اسپرماتوزوآی آن در فشاراسمزی بین mOsm/Kg ۵۰۰-۴۰۰ یعنی ۱۷/۲-۱۳/۸ در هزار ایجاد شده و در



شکل۵- میانگین مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآی کفال خاکستری در مایعات لقاح با شوریهای مختلف(۱۰،۱۵،۲۰،۲۵ در هزار) و تیمار شاهد (۳۲ در هزار) در مولدین مورد مطالعه حروف نامشابه نشان می دهند که تیمارها با هم اختلاف معنی داری دارند($P<0/05$)

فشاراسمزی بیش از ۶۰۰ mOsm/Kg (۲۰/۶ در هزار) فعالیت اسپرمی به طور ثابتی افزایش می‌یابد (۱۲). فشاراسمزی سرم خون کفال خاکستری (*M. cephalus*) ۳۴۹ mOsm/Kg می‌باشد و با محلولی با شوری ۱۲/۱ در هزار در حالت ایزوتونیک می‌باشد. علاوه بر این، فشار اسمزی سرم خون کفال خاکستری *M. cephalus*، معادل فشار اسمزی مایع اسپرمی آن است از طرف دیگر، کفال خاکستری در آب دریا تخم‌ریزی می‌کند که یک محیط هیپراسموتیک می‌باشد بنابراین اسپرم در شرایط ایزوتونیک فعال نمی‌شود (۱۲).

در ماهیان آب شور، فشار اسمزی نقش مهمی را در شروع تحرک اسپرماتوزوآ بازی می‌کند و محیط هیپراسموتیک سبب تغییر پتانسیل غشای اسپرماتوزوآ و افزایش یون Ca^{++} و pH داخلی شده و در نتیجه ضربان تاژک را فعال می‌کند (۱۱).

نتایج حاصله از این تحقیق مشخص کرد که اسپرماتوزوآی کفال خاکستری در محلول‌هایی با فشاراسمزی پایین غیرفعال است و با افزایش فشار اسمزی تحرک آغاز می‌شود. با توجه به این‌که فشاراسمزی با شوری ارتباط مستقیم دارد با محاسبه شوری تقویت‌کننده‌های مورد استفاده بر حسب گرم در لیتر مشخص می‌شود که با افزایش شوری تحرک افزایش می‌یابد و تنها استثنایی که وجود دارد در مورد تقویت‌کننده نمکی با ترکیب $pH_{7/5}$ MNaCl, ۳/۱ mMKCl, ۰/۲ mMTris, ۳/۴ $mMCaCl_2$ ۵۰۰ با شوری معادل ۳۰ در هزار می‌باشد که مدت تحرک اسپرماتوزوآ در آن بیشتر از تمام تقویت‌کننده‌های مورد استفاده می‌باشد و این موضوع به این دلیل است که جز تیمار شاهد، سایر تقویت‌کننده‌ها دارای شوری و در نتیجه فشار اسمزی کمتری نسبت به این تقویت‌کننده می‌باشند. اما در این تحقیق روش تهیه مایع لقاح با شوری ۳۲ در هزار (تیمار شاهد) به گونه‌ای است (با استفاده از آب دریاچه خزر با شوری ۱۳ در هزار و NaCl لازم) که در آن موازنه بین یون‌ها همانند آب شور ۳۲ در هزار برقرار نشده و با افزایش شوری، تنها یون سدیم و کلر تغییر کرده و

سایر یون‌ها در مقدار اولیه خود (مقدار موجود در آب دریاچه خزر) باقی مانده‌اند. اگرچه این تقویت‌کننده و تیمار شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵).

مدت تحرک اسپرماتوزوآ در ماهیان آب شور نسبت به ماهیان آب شیرین طولانی‌تر است، به گونه‌ای که در ماهیان آب شیرین خیلی کوتاه بوده و از یک دقیقه تجاوز نمی‌کند، اما در ماهیان آب شور بین ۱۰-۵ دقیقه تغییر می‌کند (۱۰). در کفال خاکستری *M. cephalus* مدت تحرک اسپرم در آب دریا ۷ دقیقه و در *M. auratus* حدود ۸ دقیقه تعیین شده است (۱۷). در حالیکه در این بررسی حداکثر مدت تحرک اسپرماتوزوآی کفال خاکستری *M. cephalus*، در آب شور ۳۲ در هزار، سه دقیقه بوده است. این موضوع ممکن است به دلیل کیفیت نامناسب مولدین این ماهی و در نتیجه اسپرم آن‌ها باشد.

آنالیز آماری (آنالیزواریانس) نشان داد که مولدهای مورد استفاده از نظر مدت تحرک اسپرماتوزوآ، با هم اختلاف معنی‌دار داشتند. آزمون دانکن تعیین کرد که مولد ۲ با مولدهای ۳ و ۴ اختلاف معنی‌دار داشته است (P<۰/۰۵). اما مولد ۱ با مولد ۲ اختلاف معنی‌دار نداشته و مولدهای ۱، ۳ و ۴ نیز با هم اختلاف معنی‌دار نداشتند (P > ۰/۰۵). در بین تکرارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P > ۰/۰۵). اختلاف مدت تحرک اسپرماتوزوآی کفال خاکستری *M. cephalus* در مولدهای مختلف به کیفیت اسپرم مربوط است که این خود بستگی به شرایط فیزیولوژیک مولد در نتیجه شیوه پرورش و نوع تغذیه آن در طول مدت پرورش دارد.

همان‌طور که گفته شد مایع سلومی در کفال خاکستری *M. cephalus*، مانع تحرک اسپرماتوزوآی آن می‌شود، اگرچه وجود آب شور ۳۲ در هزار یا تقویت‌کننده نمکی می‌تواند اثر بازدارنده آن را بپوشاند، جداکردن مایع سلومی از تخمک ماهی کفال همانند ماهی خاویاری می‌تواند سبب افزایش لقاح گردد. اما قبل از جداکردن مایع سلومی از تخمک کفال خاکستری باید روشی مناسب جهت این عمل مشخص شود زیرا تخمک این ماهی مانند تخمک ماهی خاویاری مقاوم نبوده و استفاده از تنظیف توری برای جدا کردن مایع سلومی از تخمک ممکن است سبب آسیب تخمک ظریف و شفاف کفال خاکستری گردد.

با توجه به این‌که کفال خاکستری بومی کشور ما نیست و نتوانسته است با شرایط اکولوژیک دریای خزر سازگار شود، عدم دسترسی کافی به مولدین این گونه، سبب شده که ما در مراحل اولیه مطالعه در مورد این گونه باشیم، بنابراین پیشنهاد می‌شود در مورد شرایط مناسب نگهداری مولدین در شرایط اسارت و سایر عوامل مؤثر بر فرایند لقاح تحقیق بیشتری صورت پذیرد تا در سایه امکان‌پذیری تکثیر و پرورش و دسترسی آسان‌تر به این ماهی، امکان تحقیقات افزون‌تر در مورد این گونه فراهم گردد.

تقدیر و تشکر

از همکاری ریاست محترم پژوهشکده اکولوژی دریای خزر و آقایان مهندس شافعی، قانعی، رستمیان، دکتر Krishnan و Sethi از فناوری و راهبری آبزیان آسیا (Asian Fisheries Technology & Management CO.LTD) و کارکنان محترم پژوهشکده به ویژه کارکنان بخش بیماری‌های آبزیان سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

۱- احمدیان، ن. ۱۳۷۹. مطالعه تطبیقی لقاح تخمک تاس ماهی آیرانی *Acipenser persicus* با استفاده از تقویت‌کنبده‌های اسپرم، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی تربیت مدرس، ص ۳۱.

۲- خالصی، م. ک. ۱۳۷۹. مطالعه بافت شناسی چرخه رسیدگی تخمک در ماهی کفال خاکستری *Mugil cephalus* . پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده منابع طبیعی تربیت مدرس، ص ۱۰۸.

۳- علوی، محمدهادی، ۱۳۷۹. مطالعه تطبیقی مدت زمان تحرک اسپرم تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus* در آب سالن انکوباسیون و محلول‌های تقویت‌کننده. پروژه کارشناسی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، ص۴۸.

4-Billard, R. 1983. Effects of Coelomic and Seminal Fluids and Various Saline Diluents on the Fertilizing Ability of Spermatozoa in the Rainbow Trout, *Salmo gairdneri.* J. Reprod. Fert. 68: 77-84.

5-Billard, R. 1986. Spermatogenesis and Spermatology of Some Teleost Fish Species. Reprod. Nutr. Develop. 26(4): 877-920.

Billard, R. 1995. Biology of Sperm and Artificial Reproduction in Carp. Aquaculture. 129: 92-112 6-

7-Billard, R. and Cosson, M. P. 1989. Measurement of Sperm motility in Trout and Carp. Aquaculture, a Biotechnology in Progress. N. De. Pauw, E. Jaspers, H. Ackefors and N. Wilkins,(Eds). European Aquaculture Society. Breden.Belgium. pp:499-503 .

8-Dettlaff, T. A., Ginsburg, A. S., Schmálhausen. 1993. Sturgeon Fishes. Springer Verlog Berlin. P.66.

9-Hines, R. and Yashouv, A. 1971. Some Enviromental Factores Influencing the Activity of Spermatozoa of *Mugil Cephalus* Cuvier, a Gray Mullet. Aquaculture, 3: 123-127.

10-Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. and Patzner, R. A. 1997. Sperm Structure and Motility of the Fresh Water Teleost *Cottus gobio.* Journal of Fish Biology, 50: 564-574.

11-Lahnsteiner, F. and Patzner, R. A. 1998. Sperm Motility of the Teleosts *Boops boops, Diplodus Sargus, Mullus barbatus, Trachurus mediterraneus.* Journal of Fish Biology, 52: 726-742.

12-Lee, C. S., Tamaru, C. S., Kelley, C. D., Moriwake, A. and Miyamoto, G. T. 1992. The Effect of Salinity on the Induction of Spawning and Fertilization in the Striped Mullet,*Mugil Cephalus.* Aquaculture,102: 289-296.

13-Morisawa, M., Suzuki, K. and Morisawa, S. 1983. Effects of Potassium and Osmolality on Spermatozoan Motility of Salmonid Fishes. J. Exp. Biol. 107: 105-113.

14-Nash, C. E., Shehadeh, Z. H. 1980. Review of Breeding and Propagation Techniques for Grey Mullet, *Mugil Cephalus* L. ICLARM Studies and Reviews 3. Int. Cent. Living Aquatic Resources Management, Manila, 87 pp.

15-Sethi, U. S. 2001. Incaptive Propagation and Seed Production of Gray Mullet(*Mugil cephalus*). Asian Fisheries Tech. & Mang. Co. LTD .

16-Toth, G. P., Cieresko, A., Chrirst, S. A., Dabrowski, K. 1997. Objective Analysis of Sperm Motility in the Lake Sturgeon, *Acipenser fulvescens*: Activation and Inhibition Conditions. Aquaculture, 154: 337-348.

17-Zaki, M. I., Garabavi, M. M. E. and Assem, S. S. 1993. Characteristics of Spermatogenesis and the Production of Sperm in the Gray Mullet, *Liza Ramada.* Journal of Ichthyology. 33(7): 152-158.

The Influence of Extenders on Motility Duration of Gray Mullet (*Mugil cephalus*) Spermatozoa

S. Yeganeh[1] B. Mojazi Amiri[2] M. Yousefian[3] M. A. Nematollahi[4]

Abstract

The goal in this study, was to monitor motility duration of *Mugil cephalus* spermatozoa in different extenders. Fifteen extenders were used in the study which include: Coelomic fluid of four different concentrations (nondiluted, 0.1%, 1% and 10%) BSA(Bovine Serum Albumin) with two concentrations (10mg/ml, 30mg/ml diluted in distilled water), Two saline extenders: 1. (45mMNaCl, 5mMKCl, 2.5mMTris, 19mMGlycin, pH_8), 2. (500mMNaCl, 3.1mMKCl, 0.2mMTris, 3.4mM$CaCl_2$, $pH_{7.5}$) Two solutions of NaCl(50mM, 250mM)that were used following centrifuging of milt and separating of spermatozoa. These solutions were used to replaced seminal fluid.

Fertilizing fluid with 5 different salinities of 10, 15, 20, and 25ppt along with 32 ppt, used as control. The duration of sperm motility varied widely in different extenders. Spermatozoa were inactive in coelomic fluid of different concentrations, in either of BSA,saline extender number1, both solutions of NaCl as well as fertilizing fluid with salinity of 10ppt.

Mean duration of sperm motility ranged between 77.6-149. 3, 26.66-68.6, 43.33-132.3, 59-135.3, and 73.33-138 seconds in saline extender 2, fertilizing fluid with salinities of 15, 20, 25, 32 (control) ppt respectively. The longest duration of sperm motility was achieved in saline extender number 2 namely (500mMNaCl, 3.1mMKCl, 0.2mMTris, 3.4mM$CaCl_2$, $pH_{7.5}$).

Results Finally indicated that *M. cephalus* spermatozoa are active in hyperosmotic solutions.

Keywords: Extender, Sperm motility, *M.cephalus,* Coelomic fluid, Fertilization.

[1]-*Former Gratuate Student of Fisheries and Ph.D Candidate of fisheries, Agricultural and Natural Resources of university of Gorgan. (E-mail: skyeganeh@yahoo.com)*

[2]-*Associate Professor, Faculty of Natural Resources, University of Tehran.*

[3]-*Assistant Professor, Ecological Institute of Caspian Sea, Sari*

[4]-*Instructor, Faculty of Natural Resources, University of Tehran.*