همبستگي خصوصيات كيفي اسپرم مولدان نر در روند تكثير ماهي قزل‌آلاي رنگين‌كمان (*Oncorhynchus mykiss*)

رضا لرستاني[١]، محمدرضا احمدي*[٢] و محمدرضا كلباسي[٣]
[١] دانش آموخته دوره كارشناسي‌ارشد شيلات، دانشكده منابع طبيعي نور، ايران
[٢] دانشيار گروه بهداشت و بيماري هاي آبزيان، دانشكده دامپزشكي، دانشگاه تهران، ايران
[٣] دانشيار گروه شيلات، دانشكده منابع طبيعي نور، ايران
(تاريخ دريافت: ٨٤/٥/٢٩، تاريخ تصويب: ٨٥/١٠/٢٣)

چكيده

در تحقيق حاضر ١٥ مولد نر در سه گروه سني 2^+ ، 3^+ و 4^+ ساله و ٨ مولد ماده براى بررسي رابطه اسپرماتوكريت و مدت زمان تحرك اسپرم به عنوان شاخص كيفي آن در سن‌هاي متفاوت مولدان نر با ميزان باروري و چشم زدگي تخمك‌ها در قزل‌آلاي رنگين كمان استفاده شد. در هر سن ٥ مولد نر به كار رفت. نتايج اين تحقيق نشان داد كه متوسط اسپرماتوكريت مولدان نر همسن با لقاح ($r = ٠/٨٠٤$) و چشم زدگي ($r = ٠/٨٣٦$) مثبت و معني دار بود. همبستگي متوسط اسپرماتوكريت مولدان نر همسن با مدت زمان تحرك اسپرم منفي و معني دار بود ($r = -٠/٣٧٤$) و همبستگي مدت زمان تحرك اسپرم با لقاح ($r = ٠/٢٧١$) و چشم زدگي ($r = ٠/٠٣١$) معني دار نبود. متوسط اسپرماتوكريت مولدان در سن‌هاي متفاوت اختلاف معني داري داشت، در اين خصوص 2^+ سالگي بيشترين مقدار اسپرماتوكريت (٣٢/٦٦±./٤٦ درصد) و سن 3^+ كمترين مقدار اسپرماتوكريت (٢٣/٢٦±./١٨ درصد) را داشت. كمترين مدت زمان تحرك اسپرم در 2^+ سالگي (٢٤/٥±./٢ ثانيه) و بيشترين مدت زمان تحرك اسپرم در 4^+ سالگي (٢٧/٤٠±./١٤ ثانيه) مشاهده شد ($p \leq ٠/٠٣$). مقدار لقاح در 2^+ سالگي بيشتر (٨٧/٥٢±١/١٦ درصد) ازسنين ديگر بود كه اختلاف معني داري را نسبت به سن‌هاي 3^+ (٧٩/٣٩±٢/٢٠) و 4^+ (٨٠/٤٥±٢/٠٢) ساله نشان داد ($p \leq ٠/٠٣١$). اسپرم مولدان 2^+ ساله موجب بيشترين چشم زدگي تخمك‌ها شد (٨٢/٥٢±١ درصد) كه اختلاف معني داري را با 3^+ سالگي (٧٤/٦٠±١) و 4^+ سالگي (٧٩/٥±٠/٧) نشان داد، در حالي كه 3^+ سالگي (٧٤/٦٠±٠/٨) كمترين چشم زدگي را نشان داد ($p\leq ٠/٠٢$).

واژه هاى كليدي: اسپرماتوكريت، تحرك اسپرم، باروري، قزل‌آلاي رنگين كمان و كلاردشت

نويسنده مسئول:* تلفن: ٠٢١-٦١١١٧٠٩٢ فاكس: ٠٢١-٦٦٩٣٣٢٢٢ E-mail: mahmadi@ut.ac.ir

مقدمه

از عوامل موثر در تعيين كيفيت اسپرم، غلظت يا تراكم آن است كه به تعداد اسپرم در واحد حجم تعريف مي شود. غلظت اسپرم در ماهيان نر مختلف، متفاوت بوده و حتي در اسپرم‌گيري‌هاي مختلف در طول يك يا چند هفته متغير است (۷). غلظت اسپرم با حجم آن رابطه معكوس دارد (۱۷)، اما هنوز رابطه آن با ديگر عوامل كيفي مني همانند تحرك و قابليت لقاحي اسپرم به درستي مشخص نشده است (۴). آزمايش‌هايي كه در مورد به تاخير انداختن لقاح[1] گامت‌ها بعد از فعال‌سازي صورت گرفته،به‌وضوح نشان مي دهد كه لقاح بشدت تابع تحرك اسپرم است (۱۳). ارتباط بين تحرك اسپرم و قابليت لقاحي مبهم باقي مانده است، اما رابطه مثبتی در مراكز تكثير ماهي قزل‌آلاي رنگين كمان در اين خصوص وجود دارد (۱۴)، زيرا مدت زمان تحرك اسپرم نشان‌دهنده زمان لازم براي عمل لقاح است. شرايط تخمک ها در اين تحقيق با مخلوط كردن آنها ثابت نگه داشته شده است. در حال حاضر، پژوهش‌ها در مورد تحرك اسپرم در ماهيان در آزمايشگاه هاي زيادي به منظور بهبود فرايند لقاح و كنترل توليد مثل در سطوح آبزي پروري اقتصادي و بازسازي ذخاير در حال انجام است (۴).

اثر محلول‌هاي تقويت‌كننده و مايع سلوميک در لقاح تاس‌ماهي ايراني توسط احمديان در سال ۱۳۸۱ بررسي شد. نتيجه اين تحقيق نشان می داد كه مايع سلوميک بدون رقيق كردن بر تحرک اسپرماتوزوآ اثر بازدارنده دارد، بنابراين لقاح صورت نمي‌گيرد، درصورتي‌كه استفاده از آن با غلظت ۱درصد نسبت به غلظت ۰/۱درصد موجب افزايش بيشتري در لقاح مي شود.

اثر تقويت‌كننده‌ها برمدت زمان تحرک اسپرم و توان لقاح در كفال خاكستري توسط يگانه در سال ۱۳۸۱ بررسي شد . نتايج اين تحقيق نشان داد كه مي‌توان از محلول تقويت‌كننده نمكي همراه با مايع لقاحي با شوري ۳۲ درصد به عنوان القا كننده تحرک اسپرم در لقاح كفال خاكستري استفاده كرد.

بررسي مقايسه‌اي تحرك اسپرم تاس‌ماهي ايراني و قابليت لقاحي آن در آب شيرين و محلول‌هاي نمكي در سال ۱۳۸۱،توسط علوي صورت گرفت. نتايج اين تحقيق حساسيت زيستي اسپرماتوزوآي تاس ماهي ايراني به يون‌هاي كلسيم، منيزيم و فشار اسمزي را نشان داد. همچنين قابليت لقاح اسپرم بعد از رقيق‌سازي در محلول نمكي افزايش مي يابد.

تاكنون تحقيقي در زمينه مدت زمان تحرک اسپرم و مقدار اسپرماتوكريت در ماهي قزل‌آلاي رنگين كمان در ايران صورت نگرفته است. هدف از اين تحقيق، بررسي رابطه ميزان اسپرماتوكريت و مدت زمان تحرک اسپرم به عنوان شاخص‌هاي كيفي اسپرم در سن‌هاي متفاوت مولدان نر قزل‌آلاي رنگين كمان با باروري و چشم‌زدگي تخمک‌هاي قزل‌آلاي رنگين‌كمان است.

مواد و روش‌ها

تحقيق حاضر در آبان ماه ۱۳۸۲ و در مركز تكثير و پرورش آزاد ماهيان شهيد باهنر كلاردشت انجام گرفت. برای انجام عمليات تكثير از ۸ ماهي ماده و ۱۵ ماهي نر استفاده شد. ماهي‌هاي نر به روش‌هاي متداول (پرافكنده حقيقي، ۱۳۷۹) تعيين سن شدند و در ۳ گروه سني $^{+}$۲،$^{+}$۳ و $^{+}$٤ ساله قرار گرفتند. هر گروه سني در استخر ۱ متر مكعبي با ورودي آب يک منبع و با يک دبي آب مشخص قرار داده شدند كه شرايط را براي هر سه گروه سني نر يكسان كرد. هيچ كدام از گروه هاي سني مولدان تا استحصال اسپرم از آنها تغذيه نشدند، زيرا مدفوع دفع شده از ماهيان سبب مشكل ساختن اسپرم‌گيري می شود. ابتدا ماهي‌هاي ماده توسط ماده MS_{222} بي هوش شده و تخمك‌هاي مورد نياز برای لقاح تهيه شد. برای يكسان شدن شرايط تكثير براي تمام تيمارها

۱- Delayed Insemination of Gametes

تخمك‌هاي استحصال شده از ماهيان ماده مخلوط شدند (١٤). در هر يک از سطوح سني نر ٥ مولد انتخاب شد و از ماهيان نر استحصال اسپرم صورت گرفت و در عمليات تكثير مورد استفاده قرار گرفت.

به دليل احتمال عقيم بودن يا كيفيت نامناسب اسپرم در بعضي از مولدان يا كيفيت خوب اسپرم در بعضي ديگر، در هر رده سني اسپرم‌هاي مولدان نر با هم مخلوط شد. بدين منظور در هر سطح سني، از ٥ مولد نر انتخاب شده، به صورت جداگانه استحصال اسپرم صورت گرفت و اسپرم‌ها در ٥ پليت جداگانه نگهداري شدند. سپس با استفاده از ميكروپيپت از هر پليت ٤ سي سي اسپرم برداشته شده و با هم مخلوط شد. بعد از مخلوط كردن اسپرم‌ها به صورت جداگانه در هر رده سني، پليت‌هاي C,B,A حاصل شد كه پليت A مخلوط اسپرم مولدان نر $^{+}$٢ ساله،پليت B مخلوط اسپرم مولدان نر $^{+}$٣ ساله و پليت C مخلوط اسپرم مولدان نر $^{+}$٤ ساله بود. پليت‌هاي C,B,A به همراه مخلوط تخمك‌هاي استحصال شده از مولدان ماده درون يونوليتي كه كف آن پودر يخ (براى حفاظت از گامت‌ها) بود، قرار گرفتند و به سالن تكثير انتقال يافتند. در هر يك از سطوح سني $^{+}$٢، $^{+}$٣ و $^{+}$٤، دست كم ٣ لقاح به عنوان سه تكرار صورت گرفت كه در سه سطح سني، در مجموع ٣ تيمار و ٩ تكرار صورت پذيرفت. براي هر سطح سني، براى فعال‌سازي اسپرم آنها به وسيله آب و انجام لقاح در گروه، سه دسته تخمك ٥٠ سي سي توسط پيمانه (حدود ٥٠٠ عدد تخمك) از تخمك‌هاي مخلوط شده مولدان ماده جدا شده و با استفاده از تنظيف،مايع سلوميك از تخمك‌ها جدا شد. سپس هر دسته تخمك جداگانه در ظروف پلاستيكي متوسط قرار شده و براي هر ظرف، ٥/ سي سي اسپرم از پليت مخلوط اسپرم مولدان نر با استفاده از ميكروپيپت برداشته شده و با تخمك‌هاي موجود در آن به خوبى مخلوط شد. به منظور فعال سازي اسپرم و انجام عمل لقاح ٥ سي سي آب به هر ظرف اضافه شده و به مدت ٢ دقيقه كاملا هم زده شده تا لقاح كامل شود. سپس براى حذف اسپرم‌هاي اضافه و پوسته‌ها، تخم‌هاي موجود در هر ظرف، به دقت شست وشو شدند. در مرحله بعد يك تراف آبگيري و جريان ملايمي از آب در آن ايجاد شد. تخمك‌هاي لقاح يافته موجود در ظروف پلاستيكي بعد از شست وشو، در آبكش‌هايي كه پيشتر شماره‌گذاري شده بودند، قرار گرفته و براى جذب آب به مدت ٥/ ساعت در تراف قرار گرفتند. براى انكوباسيون تخم‌هاي لقاح يافته، ١ تراف و ٣ سيني به كار رفت. هر سيني توسط نئوپلاست به ٣ قسمت مساوي تقسيم شد و تمام قسمت‌هاي تقسيم بندي شده سيني‌ها به‌طور تصادفي شماره‌گذاري شدند و تخمك‌هاي لقاح يافته،پس از جذب آب، به طور كاملا تصادفي در جايگاه خود در سيني‌ها قرار گرفتند. ٢ روز بعد از لقاح تا بعد از مشاهده اولين تفريخ تخم‌ها، تخم‌ها به وسيله مالاشيت گرين براى پيشگيري از قارچ‌زدگي ضدعفوني شدند.مقدار مالاشيت گرين مورد استفاده براي هر تراف ١ گرم در ليتر بود كه تخم‌ها يك روز در ميان به مدت ٤٥ الي ٦٠ دقيقه در معرض اين ماده قرار مي گرفتند (شرايط معمول كارگاه). براى سنجش اسپرماتوكريت نمونه‌برداري به وسيله لوله ميكروهماتوكريت از مخلوط اسپرم هر گروه سني انجام گرفت (١٥، ١٨ و ٤). بعد از نمونه برداري يك طرف لوله،به وسيله خمير مجسمه سازي در رنگ‌هاي متفاوت براى تمايز سن‌ها از هم،مسدود شد. سپس نمونه‌ها به وسيله دستگاه ميكروسانتريفيوژ (٤، ١٥ و ١٣) به مدت ٥ دقيقه و با دور ٢٠٠٠g سانتريفيوژ شدند (١٩) و بعد به وسيله خط‌كش مخصوص سنجش درصد اسپرماتوكريت، اسپرماتوكريت هر نمونه قرائت شد.

به منظور سنجش مدت زمان تحرك اسپرم در سطوح سني متفاوت، از مخلوط اسپرم‌هاي مولدان در سطوح سني $^{+}$٢ (پليت A)، $^{+}$٣ (پليت B) و $^{+}$٤ (پليتC) استفاده شد. بدين منظور يك قطره اسپرم از پليت A (به عنوان مخلوط اسپرم‌هاي ماهيان نر $^{+}$٢ ساله) روي لام در زير ميكروسكوپ قرار داده شده و يك قطره آب كارگاه با آن مخلوط شده و

مدت زمان تحرك اسپرم بلافاصله با استفاده از زمان سنج ثبت شد. مدت زمان تحرك اسپرم تا زماني كه تحرك ٩٩ الي ٩٥ درصد سلول ها بر اساس مشاهده مستقيم سلول‌هاي اسپرم در زير ميكروسكوپ، متوقف شوند، در نظر گرفته شد (٥، ٤، ١٠، ١٣، ١، ٤ و ٥). اين آزمايش حداقل ٣ بار به عنوان ٣ تكرار در هر يك از پليت‌هاي C,B,A كه به ترتيب نشان دهنده متوسط اسپرم مولدان نر $^{+}$٢، $^{+}$٣ و $^{+}$٤ ساله صورت پذيرفت. بر اساس گزارش هاى Bromage and Cumaranatunga در سال ١٩٩٨ و Billard و همكاران ١٩٩٥، بهترين زمان براى محاسبه درصد لقاح حدود ٧ روز پس از لقاح است. براى سنجش درصد لقاح، ١٠٠ عدد تخمک از هر تكرار در محلول استوكهارد[1] كه شامل اسيد استيک و فرمالين است، قرار گرفت و سپس تخمک‌هايي كه داراي كمربند عصبي بودند، به عنوان تخمک‌هاي لقاح يافته شمارش شدند. دماي آب انكوباسيون تخمک‌ها در روز تعيين درصد لقاح ١٠ درجه سانتيگراد بود. مقدار لقاح تخمک‌ها مطابق رابطه زير (رابطه ١) محاسبه و ثبت شد:

=ميزان لقاح (رابطه ١)

١٠٠* (تعداد كل تخمک‌ها / تعداد تخمک‌هاي لقاح يافته)

به منظور شوك دهي تخم‌ها و تعيين چشم زدگي حدود ١٩ روز پس از لقاح، بسته به درجه حرارت آب، با روش سيفون كردن تخمک‌ها (٤ و ٣)، تخم‌هاي چشم زده از تخم‌هاي تلف شده مشخص شد. در اين مرحله تخمک‌هاي تلف شده سفيد شدند و با استفاده از پوآر جمع آوري و شمارش شدند. تخم‌هاي چشم زده نيز در اين مرحله به دقت شمارش شدند و بازماندگي تخم‌ها تا مرحله چشم زدگي از طريق رابطه ٢ محاسبه و ثبت شد (٣):

= چشم زدگي (رابطه ٢)

١٠٠* (تعداد تخمک‌هاي چشم زده/ تعداد تخمک‌هاي لقاح يافته)

١- clearing solution (Stockard's solution): Formaldehyde 5%+ Acetic acid 4%

تجزيه و تحليل آماري

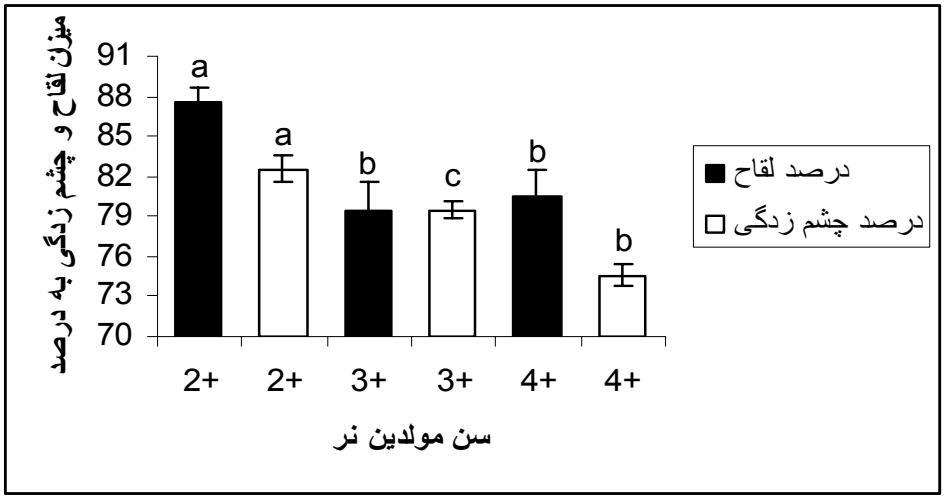
اطلاعات جمع آوري شده از بررسي‌ها و تحقيقات ميداني و آزمايشگاهي با استفاده از نرم‌افزار spss و به شرح زير تجزيه و تحليل شدند. ابتدا تاييد نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون كولموگراف اسميرنف صورت گرفت. داده‌هايي كه نرمال نبودند، با روش آرک سينوس، نرمال شدند. براي تجزيه و تحليل داده‌هاي متوسط اسپرماتوكريت مخلوط اسپرم‌هاي مولدان در سطوح متفاوت سني به سبب نرمال نشدن آنها از روش غير شاخصي استفاده شد. براى سنجش تاثير سن بر لقاح، چشم‌زدگي و مدت زمان تحرك اسپرم درمولدان نر $^{+}$٢، $^{+}$٣ و $^{+}$٤ ساله، از آناليز واريانس يكطرفه استفاده شد. در صورت مشاهده اختلاف بين داده‌ها از آزمون چنددامنه‌اي دانكن براى مقايسه ميانگين‌ها در سطح ٩٥ درصد استفاده شد. در خصوص بررسي همبستگي اسپرماتوكريت و تحرك اسپرم با يكديگر و همبستگي هر دوشاخص ياد شده با لقاح و چشم‌زدگي از ضريب همبستگي پيرسون و اسپيرمن استفاده شد.

نتايج

نتايج حاصل از ضريب همبستگي پيرسون نشان مي دهد كه متوسط اسپرماتوكريت در مخلوط اسپرم‌هاي مولدان نر همسن با لقاح همبستگي مثبت و معني‌داري در سطح ٩٩% (r=./٨٠٤) دارد. همچنين متوسط اسپرماتوكريت در مخلوط اسپرم‌هاي مولدان نر همسن با چشم‌زدگي (r=./٨٣٦) همبستگي مثبت و معني‌داري را نشان داد. متوسط اسپرماتوكريت در مخلوط اسپرم‌ها ي مولدان نر همسن با مدت زمان تحرك اسپرم، در سطح ٩٥ درصد همبستگي معني‌دار و منفي دارد (r= -./٣٧٤). مدت زمان تحرك اسپرم، با لقاح (r= -./٢٧١) و چشم‌زدگي (r= -./٠٣١) همبستگي معني‌داري ندارد. نتايج به دست آمده از آزمون چنددامنه‌اي دانكن نشان مي دهد كه بين لقاح مولدان نر $^{+}$٢

(١/١٦±٨٧/٥٢ درصد) و $^{+}$٣ سالگي (٢/٢٠±٧٩/٣٩) اختلاف معني‌داري در سطح ٩٥ درصد وجود ندارد، درحالي‌كه لقاح در اين دو سن با لقاح مولدان نر $^{+}$٤ ساله (٢/٠٢±٨٠/٤٥) اختلاف معني‌داري را در سطح ٩٥ درصد نشان مي دهد. لقاح مولدان نر $^{+}$٢ (١/١٦±٨٧/٥٢ درصد) ساله در اين حالت بيشترين و لقاح مولدان نر $^{+}$٤ ساله (٢/٠٢±٨٠/٤٥) كمترين مقدار است. در مولدان نر $^{+}$٣ ساله (٢/٢٠±٧٩/٣٩)، مقدار لقاح حد واسط دو سن ديگر است (نمودار ١).

نتايج آزمون دانكن نشان داد كه بين درصد چشم زدگي در $^{+}$٢، $^{+}$٣ و $^{+}$٤ سالگي اختلاف معني‌داري وجود دارد. چشم‌زدگي در $^{+}$٢ ساله‌ها بالاترين مقدار (١±٨٢/٥٢ درصد) و در $^{+}$٤ ساله‌ها (٠/٧±٧٩/٥٠) كمترين مقدار است. چشم‌زدگي مولدان نر $^{+}$٣ ساله (٠/٨±٧٤/٦٠) حد واسط دو سن ديگر است.



شكل ١- تغييرات درصد لقاح و چشم زدگي در سن‌هاي متفاوت مولدان نر

نتايج آزمون چنددامنه‌اي دانكن نشان مي‌دهد، بين مدت زمان تحرك اسپرم حاصل از مولدان نر$^{+}$٢، $^{+}$٣ و $^{+}$٤ ساله در سطح ٩٥ درصد اختلاف معني‌داري وجود دارد. بدين صورت كه مدت زمان تحرك اسپرم مولدان نر$^{+}$٢ ساله كمترين مقدار (٠/٢±٢٤/٥٠ ثانيه) بود. بيشترين مدت زمان تحرك اسپرم در مولدان نر $^{+}$٤ ساله مشاهده شد (٠/١٤±٢٧/٤٠ ثانيه). بين مدت زمان تحرك اسپرم مولدان نر $^{+}$٣ (٠/٣٥±٢٥/٥٠ ثانيه) و با $^{+}$٢ و $^{+}$٤ ساله ها در سطح ٩٥ درصد اختلاف معني‌داري مشاهده نمي‌شود.

جدول ١- متوسط مدت زمات تحرک اسپرم مولدان نر

	$\overline{X}$ (ثانیه)	subsets
مولدان نر +٢ ساله	٠/٢±٢٤/٥٠	b
مولدان نر +٣ ساله	٠/٣٥±٢٥/٥٠	a.b
مولدان نر +٤ ساله	٠/١٤±٢٧/٤٠	a

نتايج آزمون غير پارامتري در مورد غلظت اسپرم‌هاي مولدان نر (اسپرماتوكريت) به شرح جدول زير است (جدول١):

جدول ٢- متوسط اسپرماتوكريت در مخلوط اسپرم‌هاي مولدان نر هم سن

subsets	$\overline{X}$	
a	٣٢/٦٦	مولدان نر +٢ ساله
c	٢٣/٢٦	مولدان نر +٣ ساله
b	٢٦/١٦	مولدان نر +٤ ساله

بين متوسط اسپرماتوكريت در مخلوط اسپرم‌هاي مولدان نر $^{+}$٢، $^{+}$٣ و $^{+}$٤ ساله اختلاف معني‌داري در سطح ٩٩ درصد وجود دارد (p=/٠٠٠) كه در مولدان نر $^{+}$٢ ساله بيشترين مقدار و در مولدان نر $^{+}$٣ ساله كمترين مقدار مشاهده مي شود. متوسط اسپرماتوكريت در مخلوط اسپرم $^{+}$٤ ساله‌ها حد واسط دو سن ديگر است.

بحث

نتايج اين تحقيق نشان داد كه مولدان $^{+}$٢ ساله بيشترين غلظت اسپرم، همچنين همزمان بيشترين درصد لقاح و كمترين تحرك را نسبت به دو سطح سني ديگر دارند. مولدان نر $^{+}$٣ ساله كمترين تحرك و كمترين لقاح و كمترين ميزان اسپرماتوكريت را نشان دادند (جداول ١ و ٢). در مولدان نر$^{+}$٤ ساله نيز شاخص‌هاي ذكرشده حد واسط دو سن ديگر بودند. لقاح در مولدان نر $^{+}$٢ ساله در مقايسه با مولدان نر $^{+}$٣ و$^{+}$٤ ساله بيشتر بود و تفاوت معني‌داري را نسبت به هم نشان دادند. چشم‌زدگي نيز در م مولدان نر $^{+}$٢ ساله تفاوت معني داري را با $^{+}$٣ و $^{+}$٤ ساله‌ها نشان مي دهد. با توجه به نتايج باروري و چشم‌زدگي تخمك‌ها در مولدان سن‌هاي متفاوت (نمودار١) و مقايسه آن با جدول ٢، ديده مي شود كه در مولدان نر $^{+}$٢ ساله بيشترين ميزان اسپرماتوكريت وجود دارد كه همزمان بيشترين لقاح و چشم‌زدگي را در اين مولدان مشاهده مي كنيم. همزمان با كاهش اسپرماتوكريت، لقاح، چشم‌زدگي و تفريخ نيز كاهش مي يابد كه نشان دهنده ارتباط مستقيم و مثبت بين اسپرماتوكريت اسپرم مولدان نر و لقاح وچشم‌زدگي است. چون مدت زمان تحرك اسپرم مولدان نر $^{+}$٢ ساله در مقايسه با ٢ سطح سني ديگر، كمترين مقدار است، با افزايش تعداد اسپرماتوزوآدر واحد حجم احتمال انجام لقاح بيشتر مي شود و از طرف ديگر، غلظت اسپرم مي‌تواند اثرهای كاهش مدت زمان تحرك را در لقاح جبران كند (٦).

در فعال‌سازي اسپرم با آب در $^{+}$٢ سالگي، كمترين مدت زمان تحرك اسپرم نسبت به دو سن ديگر مشاهده مي شود (جدول ١). با افزايش اسپرماتوكريت، روند كاهشي در مدت زمان تحرك اسپرم ديده مي شود. بيشترين مقدار اسپرماتوكريت مربوط به $^{+}$٢ سالگي است كه كمترين مدت زمان تحرك را در بين سه سطح سني به خود اختصاص مي دهد. در نتايج گزارش Tekin و همكاران در سال ٢٠٠٣ نيز مشاهده شد كه با كاهش غلظت اسپرم، مدت زمان تحرك اسپرم در ماهي قزل‌آلا افزايش و با افزايش غلظت اسپرم، مدت زمان تحرك اسپرم در اين ماهي كاهش يافت. نتيجه مشابهي نيز در همين گونه توسط Liley و همكاران در سال ٢٠٠٢ گزارش شده است كه در نمونه‌برداري از اسپرم ماهي قزل‌آلاي رنگين‌كمان و سنجش مدت زمان تحرك اسپرم و اسپرماتوكريت در زمان‌هاي متفاوت نمونه برداري، زماني كه مقدار اسپرماتوكريت بيشتر باشد، مدت

زمان تحرك اسپرم كاهش مي يابد. نتايج اين تحقيق در مورد اثر سن مولد نر بر مدت زمان تحرك اسپرم و اسپرماتوكريت نتايج تحقيق‌هاي مذكور را تاييد مي‌كند.

با كاهش اسپرماتوكريت تعداد اسپرماتوزوآ در واحد حجم كاهش مي‌يابد، پس ممكن است با كمتر شدن اين تعداد، مقدار ATP،يون كلسيم و يون‌هاي ديگر موثر بر مدت زمان تحرك اسپرم اختصاص‌يافته به هر سلول اسپرماتوزوآ در مقايسه با حالتي كه تعداد اسپرماتوزوآها در واحد حجم زياد باشد، بيشتر شود و مدت زمان تحرك اسپرم‌هاي رقيق افزايش يابد (١١).

لقاح از سن‌هاي كم به طرف سن‌هاي بيشتر روند كاهشي را طي مي كند. كاهش لقاح با افزايش سن ممكن است به دليل كاهش اسپرماتوكريت كه نتيجه آن كاهش اسپرماتوزوآ در واحد حجم است، باشد. همچنين با افزايش سن مولدان كيفيت اسپرم آنها (غلظت اسپرم و توانايي تلقيح تخمك‌ها) نيز كاهش مي يابد كه اين روند در نمودارهاي ١ و ٢ مشخص است.

اثر سن مولد نر بر چشم زدگي نيز همانند اثر سن مولد نر بر لقاح، كاهش چشم‌زدگي را در مولدان سنين بالا بخصوص در ٣ و ٤ ساله ها در مقايسه با ٢ ساله‌ها به وضوح نشان مي دهد و اين اختلاف در بين مولدان سن‌هاي متفاوت معني دار است. علت آن را مي توان در كاهش كيفيت اسپرم مولدان سنين بالا دانست، زيرا با افزايش سن،كيفيت اسپرم كاهش مي يابد. سن مولدان تاثير معني‌داري بر روي كيفيت اسپرم نشان مي دهد و كيفيت اسپرم وابسته به تاثير متقابل ژنتيك، فيزيولوژي و عوامل محيطي است (١٦). در سال ٢٠٠٢، Liley و همكاران گزارش كردند كه غلظت اسپرم در ماهيان نر قزل‌آلايي كه براي اولين بار اسپرم‌دهي مي كنند، در مقايسه با ماهيان نر ٣ ساله بيشتر است همچنين در سال ٢٠٠١، Hoysak and Liley گزارش دادند كه اسپرماتوكريت نرهاي ٣ ساله در مقايسه با نرهاي ٥ ساله در ماهي Sockeye salmon *(Oncorhynchus nerka)* بيشتر است.

نتايج اين تحقيق‌ها كاهش مقدار اسپرماتوكريت را از سن‌هاي بيشتر به طرف سن‌هاي كم نشان مي دهد. نتايج تحقيق حاضر نيز با يافته‌هاي تحقيق‌هاي مذكور مشابهت دارد و نتايج آنها را تاييد مي كند. نتايج اين تحقيق و روند تغييرات اسپرماتوكريت در سن‌هاي متفاوت نر به طوردقيق نتايج روند تغييرات غلظت اسپرم در تحقيق Tekin و همكاران در سال ٢٠٠٣ را تاييد مي كند.

كاهش غلظت اسپرم در سن‌هاي زياد، شايد به دليل افزايش توليد حجم اسپرم در سن‌هاي بالا باشد، زيرا هر چه اندازه مولد بزرگ تر باشد، اندازه بيضه‌ها نيز بزرگ تر مي شود و به نسبت آن حجم اسپرم افزايش می يابد و از آنجا كه رابطه حجم اسپرم و غلظت آن به صورت رابطه معكوس است (١٧)، پس با افزايش سن حجم اسپرم بيشترمی شود،اما غلظت آن كاهش مي يابد.

نتايج همبستگي متوسط اسپرماتوكريت در مخلوط اسپرم‌هاي مولدان نر همسن با لقاح و چشم‌زدگي در خصوص لقاح‌هاي حاصل از فعال‌كننده آب در تمام سن‌ها نشان داد كه بين متوسط اسپرماتوكريت در مخلوط اسپرم‌هاي مولدان نر همسن با لقاح و چشم‌زدگي همبستگي مثبت و معني‌داري وجود دارد.

Aas و همكاران نيز در سال ١٩٩١ در ماهي *Salmo salar* ارتباط بين لقاح با اسپرماتوكريت را رابطه مثبت و معني‌دار گزارش كردند. همچنين Hoysak and Liley نيز در سال ٢٠٠١ همبستگي بالا و معني دار غلظت اسپرم را بر مقدار لقاح در لقاح‌هايي كه در ماهي *Oncorhynchus nerka* انجام گرفت، گزارش كردند.

Liley و همكاران در سال ٢٠٠٢ همبستگي مثبت و معني‌داري را در ماهي قزل‌آلا بين مقدار لقاح در غلظت‌هاي زياد اسپرم، گزارش كردند. نتايج تحقيق حاضر در مورد

ارتباط لقاح و چشم‌زدگي با مقدار اسپرماتوكريت، نتايج تحقيق‌هاي مذكور را تاييد مي كند.

نتايج همبستگي متوسط اسپرماتوكريت در مخلوط اسپرم‌هاي مولدان نر همسن با مدت زمان تحرك اسپرم نشان داد كه اين همبستگي معني‌دار و به‌صورت منفي است، يعني با افزايش مقدار اسپرماتوكريت، مدت زمان تحرك اسپرم نيز كاهش مي يابد. نتايج Tekin و همكاران در سال ٢٠٠٣ و Liley و همكاران در سال ٢٠٠٢ بر روي ماهي قزل‌آلاي رنگين‌كمان، كاهش مدت زمان تحرك اسپرم با افزايش غلظت را به خوبي نشان مي دهد.

نتايج همبستگي مدت زمان تحرك اسپرم با لقاح و چشم‌زدگي نشان مي‌دهد كه مدت زمان تحرك اسپرم با لقاح و چشم‌زدگي معني دار نيست. Liley و همكاران در سال ٢٠٠٢ در ماهي قزل‌آلاي رنگين‌كمان گزارش كردند كه در مولدان ١ و ٣ ساله ارتباط مدت زمان تحرك با لقاح معني دار نيست.

Moccia and Munkittrick نيز در سال ١٩٨٧ گزارش كردند كه همبستگي مدت زمان تحرك اسپرم در غلظت‌هاي زياد اسپرم با لقاح معني‌دار نيست. نتايج تحقيق حاضر نيز تاييدكننده نتايج تحقيق‌هاي مذكور است.

به طوركلی مي توان گفت كه در مولدان نر ٢ ساله كارگاه كلاردشت، غلظت زياد سلول‌هاي اسپرم در مايع مني آنان نسبت به دو سطح سني ٣ و ٤ ساله، توانسته است خصوصيت ديگر كيفي اسپرم كه در اين تحقيق دوره مدت زمان تحرك اسپرم است،را تحت تاثير قرار دهد و موجب افزايش درصد باروري تخمک‌ها شود. واضح است كه افزايش مدت زمان تحرك اسپرم، احتمال رسيدن اسپرم‌ها به ميكروپيل و انجام عمل لقاح را افزايش مي دهد كه نتيجه آن افزايش لقاح تخمك‌هاست، ولي از آنجا كه نقطه منحصر به فردي براى نفوذ اسپرماتوزوآ (ميكروپيل) وجود دارد و طول مسير حركت يک اسپرماتوزوآ (٣ ميلي متر) كوتاه تر از قطر تخمك (٦-٤ ميليمتر) است، بنابراين يك اسپرماتوزوآ، در نزديكي تخمك شانس رسيدن به ميكروپيل را ندارد (٧)، پس واضح است افزايش غلظت و تعداد سلول‌هاي اسپرم در اطراف ميكروپيل احتمال لقاح را افزايش مي دهد. در اين تحقيق توصيه مي شود كه براى انجام لقاح مولدان داراي اسپرم غليظ استفاده شود (مولدان ٢ ساله)،اما در نبود اين شرايط مي توان از مولدانى كه مدت زمان تحرک اسپرم بيشتري دارند، براى جبران كاهش تعداد سلول‌هاي اسپرم در واحد حجم و افزايش لقاح استفاده كرد.

منابع

١- احمديان، ن. مجازي اميري، ب.. ابطحي، ب.. نظري، ر. م.. ١٣٨١. استفاده از تقويت‌كننده‌هاي اسپرم در لقاح تخمك تاس‌ماهي ايراني *Acipenser persicus* ، دومين همايش ملي منطقه‌اي ماهيان خاوياري، ص١١١- ١١٥.

٢- پرافكنده حقيقي, فرخ, ١٣٧٩.روش‌هاي تعيين سن آبزيان, موسسه تحقيقات شيلات ايران, ص ص: ١٣-١٥.

٣- پيكان حيرتي، ف. ١٣٨٠. القاء تكثير در جنس نر ماهي قزل‌آلاي رنگين كمان با استفاده از هورمون سنتتيك GnRH، پايان‌نامه كارشناسي‌ارشد، دانشگاه تهران، دانشكده منابع طبيعي كرج، ١٣٨٠، ٧٧ص.

۴- علوي، ه.١٣٨١. بررسي مقايسه اي تحرك اسپرم تاس ماهي ايراني و قابليت لقاحي آن در آب شيرين و محلول‌هاي نمكي، پايان نامه كارشناسي ارشد، دانشگاه تهران، دانشكده منابع طبيعي كرج، ١٠٥ص.

٥- يگانه، س. ١٣٨١. اثر تقويت‌كننده‌ها بر روي مدت تحرك اسپرم و توان لقاح در كفال خاكستري *Mugil cephalus*، پايان‌نامه كارشناسي‌ارشد، كرج: دانشكده منابع طبيعي دانشگاه تهران، ١١٢ص.

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

7-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

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

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

10-Billard, R., Cosson, J., Perchec, G. and Linhart. O., 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture, 124: 95-112

11-Bromage, N.R. Cumaranataunga, 1998. Egg production in the rainbow trout, In Recent advances in Aquaculture, vol:39 Muir, J.F, R.J., Robert, Eds, pp: 63-139

12-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

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

14-Hoysak, D. J. and Liley, N. R. 2001. Fertilization dynamics in *sockeye salmon* and a comparison of sperm from alternative male phenotypes. J. Fish Biol. 58:1286-1300

15-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 in vitro fertilization. Can.J. fish. Aquat. Sci. 59: 144-152.

16-Moccia, R. D. and Munkittrick, K. R. 1986. Relationship between the fertilization of rainbow trout *(Salmo gairdeneri)* eggs and the motility of spermatozoa. Theriogenology, Vol. 27 No. 4: 679-688

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

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

19-Tekin, N., Secer, S., Akcay, E., Bozkurt, Y. and Kayam, S. 2003. The effect of age on spermatological properties in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1722). Turk. J. Vet. Anim. Sci. 27: 37-44

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

21-Vladi, T.V. Afzelius, B. A. and Bronnikov, G. E. 2002. Sperm qulity as reflected through morphology in salmon altrnative lifehistories. Biology of Reproduction, 66: 98-105

Correlation of Sperm Quality of Different Rainbow Trout *(Oncorhynchus mykiss)* Brood stocks in Propagation Process

R. Lorestany [1], M. R. Ahmadi [*2] and M. R. Kalbassi [3]
[1, 3] Faculty of Natural Resources, Tarbiat modares University, Noor, I.R. Iran
[2] Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, I.R. Iran.
(Received 20 August 2005, Accepted 13 January 2007)

Abstract

In this research, 15 male brood stocks in three age groups of 2^+, 3^+ and 4^+, and 8 female brood stocks were used in order to study the correlation between the spermatocrit and the period of sperm motility as a qualitative indicator, on the one hand, and the fertilization rate and the formation rate of eyed eggs, on the other hand, were used. Five brood stocks were used in each age group. Results of the research showed that correlation between spermatocrit of male brood stocks in the same age group with fertilization rate (r=0.804) and eyed egg (r =0.836) is positive and significant. Correlation between spermatocrit of male brood stocks in one age group and the duration of motility was negative and significant (r=-0.374), and correlation between duration of motility with fertilization rate (r = 0.271) and eyed egg (r = 0.031) was not significant. There was a significant difference in the average spermatocrit of various male age groups ($P\geq0.05$) while 2^+ years males were the highest (32.66±0.46%) and 3^+ years males were lowest (23/26±0/18%) percentage of spermatocrit in this range. 2^+ years males showed lowest duration of motility (24.50±0.2 sec), and 4^+ years males showed the highest time (27.40±0.14) at ($P\leq0.03$). Fertilization rate in 2^+ years male were highest (87.52±1.16) and had significant difference as compared to 3^+ (79.39±2.2) and 4^+ (80.45±2.02) male ages ($P\leq0.031$). Eyed eggs in 2^+ years male were highest (82.52±1) and had significant difference with others groups while 3^+ years males (74.60± 0.8) showed lowest eyed egg rate.

Keyword: Spermatocrit, Sperm motility, Fertilization, *Oncorhynchus mykiss*, Iran

* Corresponding author: Tel: 021-61117092 , Fax: 021-66933222 E-mail: mahmadi@ut.ac.ir