مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال پنجم، شماره سوم، پیاپی نوزدهم، زمستان ۱۳۹۵ (۳۹-۵۰)

اثر محلول‌های فعال‌کننده اسپرم بر کارآیی تکثیر مصنوعی ماهیان گطان (*Luciobarbus xanthopterus*) و کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*)

امین طبیبی[۱]، سید محمد موسوی[۲*]، وحید یاوری[۲]، محمد ذاکری[۳]، آرش جاهدی[٤]، حسین پاشا زانوسی[٥]
۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، رشته تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
۲. دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
۳. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
٤. کارشناس ارشد، مجتمع آموزشی علمی کاربردی جهاد کشاورزی خوزستان، اهواز
۵. مربی، گروه فیزیک دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/٤/۵ – تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۱/۳۰)

چکیده
ماهی گطان از ماهیان بومی خوزستان بوده که تاکنون مطالعات زیادی روی تکثیر آن صورت نگرفته است. لذا در این تحقیق، نقش محلول‌های فعال‌کننده نمکی روی کیفیت اسپرم و قابلیت لقاحی آن در مقایسه با ماهی کپور علفخوار مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور از ۵ فعال‌کننده نمکی، آب کارگاه و آب مقطر (به‌عنوان شاهد) در ۳ تکرار استفاده گردید. پس از انتقال مولدین به سالن تکثیر و آماده سازی مولدین، اسپرم و تخم مورد نیاز استحصال گردیده و سنجش پارامترهای تحرک اسپرم صورت گرفته و سپس جهت فعال‌سازی اسپرم‌ها از فعال‌کننده های نمکی استفاده و پس از گذشت ۱۲ ساعت از عمل لقاح، وضعیت موفقیت لقاح مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصله، بیشترین میزان تحرک اسپرم و میزان لقاح در ماهی گطان به ترتیب در محلول‌های a2 (Tris Hcl 20 mM, NaCl 50mM)، a3 (CaCl2 2.5mM) و a4 (Tris Hcl 30 mM, KCl 30mM, NaCl 50mM) و کمترین آن در آب کارگاه و آب مقطر مشاهده گردید (P<۰/۰۰۱). همچنین بیشترین میزان فعالیت و تحرک اسپرم و میزان لقاح در ماهی کپور علفخوار به ترتیب در محلول‌های a2، a4 و محلول کاربامید مشاهده گردید که با سایر محلول‌های به‌کار رفته اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ داشتند. بر اساس نتایج حاصله می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که بیشترین میزان تأثیر را در بین فعال‌کننده‌های نمکی به‌کار رفته در این تحقیق محلول فعال‌کننده a2 داشت به‌طوری که باعث افزایش حدودا ۷ برابری در میزان تحرک اسپرم و افزایش ۲۰ درصدی در میزان لقاح تخم گردیده است.

واژه‌های کلیدی: ماهی گطان، کپور علفخوار، محلول لقاح، اسپرم.

Effects of activating solutions on performance of artificial propagation of *Luciobarbus xanthopterus* and *Ctenopharyngodon idella*

Amin Tabibi[1], Seyed Mohammad Mousavi[2*], Vahid Yavari[2], Mohammad Zakeri[3], Arash Jahedi[3], Hossein Pasha Zanoosi[5]
1. Fromer M.Sc. Student in the field of Aquaculture, Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran
2. Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran
3. Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran
4. Master's Degree in Aquaculture, Agricultural Jihad Educational Center of Khoozestan, Ahvaz, Iran
5. Instructor (Master's Degree), Department of Oceanography, Faculty of Marine Sciences and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran
(Received: Jun. 25, 2016 - Accepted: Feb. 18, 2017)

ABSTRACT
Gatan has distributed in the main rivers in Khoozestan province and there are few researches on propagation and reproductive system of this species. Therefore, this study has focused on using of activating solutions on sperm activity and fertilization capability in Gatan fish in comparison with Grass Carp. In this research, 5 activating solutions together with workshop water and distilled water were used in triplicate. After transferring of brood stocks to the propagation workshop and after hormontherapy, sperm and ovules were collected. Assessment of sperm activity was done and after mixing of sperm and ovules, activating solutions were used. After 12 hours of fertilization time, fertilization percentage was assessed. Based on results obtained from this study, the highest sperm activity and fertilization rate was seen in Gatan fish when a2 (Tris Hcl 20 mM, NaCl 50mM), a3 (CaCl2 2.5mM) and a4 (Tris Hcl 30 mM, KCl 30mM, NaCl 50mM) solutions were used and lowest sperm activity was seen when workshop water and distilled water were used in this species (P<0.001). Also, the highest sperm activity and fertilization rate was seen in Grass Carp when a2, a4 and 4030 solutions were used (P<0.001). Based on the results, finally it is revealed that the highest sperm activity and fertilization per cent among activating solutions has resulted from a2 activating solution combining from NaCl and Tris-Hcl in both fishes examined in this study which was led to increase of around seven times in sperm activity and around 20% in fertilization per cent.

Keywords: Luciobarbus xanthopterus, *Ctenopharyngodon idella*, Fertilization solution, Sperm.

* نویسنده مسئول: سید محمد موسوی E-mail: seied1356@yahoo.com

مقدمه

ماهی گطان *Luciobarbus xanthopterus* (Heckel, 1843) از راسته Cypriniformes، از خانواده Cyprinidae و از جنس Luciobarbus است (Fricke *et al.*,2007). این گونه در رودخانه‌های مهم دجله، فرات، کرخه و کارون (در کشورهای ایران، عراق و ترکیه) یافت شده و عمده پراکنش ماهی گطان در محدوده هورالعظیم، رودخانه کرخه تا سد حمیدیه و رودخانه اروندرود می‌باشد (Najaf pour *et al.*, 1997). متأسفانه به‌دلیل استفاده از ادوات صید ممنوعه، وقوع خشکسالی‌های اخیر و احداث سد کرخه عملاً فراوانی صید به‌طور محسوسی کاهش یافته، به‌طوری که صید آن در سال ۱۳۷۹ به صورت اتفاقی و بسیار نادر انجام می‌گرفت (Mortazavi Zadeh *et al.*, 2005). با توجه به اهمیت گونه گطان، مرکز آبزی پروری جنوب کشور در پی شناسایی بیولوژی آن (Eskandari *et al.*, 1998) در سال ۱۳۸۴ به بیوتکنیک تکثیر این گونه دست یافت (Mortazavi Zadeh *et al.*, 2005). بر اساس اطلاعات موجود اگر چه تکثیر این ماهی در ایران انجام پذیرفته است ولی به علل ناشناخته درصد لقاح و بازده تکثیر گونه مذکور رضایت‌بخش نبوده است. از آنجا که در بعضی از گونه‌ها، استرس ناشی از شرایط محیط پرورشی، منجر به عدم حصول شرایط بهینه جهت رسیدگی جنسی و تکمیل پروسه تولید مثل شده و به ناچار تزریق هورمون جهت القاء رسیدگی جنسی این ماهیان الزامی می‌باشد (Metwally & Fouad, 2008). به نظر می رسد این عوامل از جمله علل کاهنده بازده تکثیر این ماهی باشد که لزوم پرداختن به ابهامات علمی این امر ضرورت تحقیق حاضر را تبیین می‌نماید. همچنین ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella* Cuvier & Valenciennes, 1884) از راسته Cypriniformes، از خانواده Cyprinidae و از جنس *Ctenopharyngodon* است. فصل تکثیر این ماهی در استان خوزستان در اواخر فروردین و در دمای ۲۱ تا ۲۳ درجه سانتی گراد می‌باشد (Farid pak, 2007).

از آنجا که جهت حصول درصد لقاح بالا و لاروهای با کیفیت در ماهیان، دسترسی به اسپرم با کیفیت نیز ضروری است و از جمله فاکتورهای با اهمیت در خصوص کسب لقاح مصنوعی با کارایی بالا تلقی می‌گردد (Verma *et al.*, 2009; Secer *et al.*, 2004). در مراکز تکثیر و پرورش ماهی، بیشتر به کیفیت تخمک‌ها و لاروها توجه می‌شود، در حالی‌که کیفیت اسپرم و تخمک، به‌طور مشترک، می‌توانند بر موفقیت لقاح و بازماندگی لاروها تأثیرگذار باشند و در تعدادی از گونه‌ها، کیفیت پایین اسپرم می‌تواند فاکتور محدودکننده پرورش آنها تلقی گردد، به هر حال، حتی زمانی که موفقیت لقاح بالا باشد، تفاوت‌های کیفی اسپرم در میان نرهای متفاوت، در زمانی که اسپرم چند ماهی نر با هم جهت انجام لقاح مخلوط می‌شوند، ممکن است خلوص ژنتیکی را در نسل‌های بعد کاهش داده و اندازه جمعیت مولدین آتی را نیز کاهش دهد. پس مطالعه در خصوص ترکیبات اسپرم در جهت شناخت وقایعی که منجر به تولید گامت با کیفیت می‌شود و همچنین فاکتورهایی که کیفیت اسپرم را کاهش می‌دهند، الزامی است (Bozkurt *et al.*, 2006). کیفیت اسپرم نیز بر اساس پارامترهای عمومی تحرک، غلظت (Cejko *et al.*, 2008) و میزان موفقیت لقاح تخمک‌ها (Secer *et al.*, 2004) مشخص می‌شود. همچنین کیفیت اسپرم به‌وسیله محتوی پروتئین، فشار اسمزی و فعالیت‌های آنزیمی پلاسمای منی نیز سنجش می‌شود (Cejko *et al.*, 2008). مهمترین مشخصه کیفی اسپرم، تحرک سلول‌های اسپرماتوزوئید می‌باشد (Kalbasi & Lorestani, 2006).

غلظت اسپرم در ماهیان نیز خصوصیتی است که می‌تواند از طریق تغییر در فعالیت‌های بیوشیمیایی و آنزیمی پلاسمای منی، میزان لقاح تخمک‌ها را تحت تأثیر قرار دهد که در مطالعات مختلف، روش سنجش درصد اسپرماتوکریت به‌عنوان یک تکنیک سریع، ساده و با کارایی بالا جهت تخمین غلظت اسپرم

معرفی شده است (Hatef *et al.*, 2007). روش ارزیابی کیفی اسپرم بر طبق قابلیت لقاحی آن برای تخمک‌ها نیز به‌طور گسترده‌ای در آبزی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرد (Pavlov, 2006). به‌دلیل پراکنش محدود جغرافیایی سس ماهیان بومی، تاکنون مطالعات زیادی بر روی تکثیر آن صورت نگرفته (Khajeh *et al.*, 2007) و این مهم بر عهده محققین شیلاتی کشورهای دارای این ذخیره ارزشمند است.

لذا با توجه به موارد فوق الذکر، انجام تحقیق حاضر در خصوص بهبود بیوتکنیک مناسب تکثیر ماهی گطان در جهت افزایش کارایی تکثیر آن که دارای درصد لقاح پایینی بوده، از طریق مطالعه کیفیت اسپرم و بررسی پارمترهای کیفی اسپرم ضروری به نظر می رسد. در این تحقیق نقش محلول‌های فعال‌کننده نمکی روی کیفیت اسپرم و قابلیت لقاحی آن در ماهی گطان در مقایسه با یک گونه از کپور ماهیان (کپور علفخوار) مورد مطالعه و ارزیابی قرار می گیرد.

مواد و روش‌ها

مراحل عملیاتی این تحقیق در مرکز توسعه ماهیان بومی دشت آزادگان استان خوزستان از ابتدای اسفندماه سال ۱۳۹۰ آغاز شده و تا پایان فصل تکثیر ماهی گطان (فروردین‌ماه ۱۳۹۱) ادامه یافت و پس از نمونه‌برداری‌های میدانی، باقی مراحل در آزمایشگاه شیلات دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر انجام پذیرفت. به این منظور از ۵ فعال‌کننده نمکی (مطابق جدول ۱)، آب کارگاه و آب مقطر (به عنوان شاهد) در ۳ تکرار استفاده گردید.

جدول ۱. ترکیبات فعال‌کننده‌های اسپرم کپور ماهیان مورد استفاده در این تحقیق

ترکیبات محلول‌ها	NaCl	KCl	Tris-Hcl	CaCl2	رفرنس
فعال‌کننده a1	–	–	۳۰mM	۱۰ mM	Warnecke and Pluta, 2003
فعال‌کننده a2	۵۰ mM	–	۲۰mM	–	Alavi *et al.*, 2009
فعال‌کننده a3	–	–		۲,۵ mM	Alavi *et al.*, 2009
فعال‌کننده a4	۵۰ mM	۳۰ mM	۳۰mM	–	Bastami *et al.*, 2009
محلول ۴۰/۳۰	۳۰ گرم اوره و ۴۰ گرم نمک در ۱۰ لیتر آب				Farid Pak, 2007

جهت انتقال مولدین ماهی گطان و کپور علفخوار از مخازن فایبر گلاس محتوی ماده بیهوشی MS222 به مقدار ۱۰۰ میلی گرم در لیتر استفاده گردید (Farid Pak, 2007). جهت هورمون تراپی مولدین نر که پیش از تزریق هورمون در مرحله ۴ رسیدگی جنسی قرار داشتند، از هورمون LHRHa II ساخت کشور چین بدون دوپامین با دوز ۵ میکروگرم به ازاء هرکیلوگرم وزن بدن ماهی در زیر باله سینه‌ای، جهت تحریک تولید اسپرم در ماهیان نر گطان و کپور علفخوار استفاده گردید. حجم تزریق هورمون به ازاء هر کیلوگرم وزن ماهی معادل ۰/۵ میلی‌لیتر تزریق صورت پذیرفت (Mikolajczyk *et al.*, 2004; Yousefian *et al.*, 2008). در هر دوره از تکثیر ۹ ماهی مورد تزریق قرار گرفتند و از تعداد ۳ عدد از ماهیان مورد تزریق، اسپرم‌گیری به‌عمل آمد (Yousefian *et al*, 2008; Caille *et al.*, 2006).

مولدین ماده نیز به ازاء هرکیلوگرم وزن بدن به میزان ۴ میلی گرم هیپوفیز تزریق شدندکه این تزریق در دو مرحله و به فاصله ۱۲ساعت انجام شد. تزریق اول به میزان۱۰درصد هیپوفیز محاسبه شده کل و تزریق دوم همزمان با تزریق نرها و به میزان۹۰ درصد هیپوفیز محاسبه شده کل اعمال شد. همچنین

خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب کارگاه مورد بررسی و سنجش قرار گرفت به‌طوری که میزان دما ۱/۵±۲۳ درجه سانتی‌گراد و اکسیژن ۰/۷ ± ۸/۶ میلی گرم در لیتر بود.

پس از گذشت زمان مناسب از تزریق دوم (حدود ۱۰ساعت برای ماهی گطان و ۷ ساعت برای ماهی آمور)، از مولدین ماده به روش مالشی تخم کشی انجام پذیرفت و تخمک‌های حاصل شده از مولدین ماده، در یک ظرف جهت یکسان شدن شرایط آزمایش، مخلوط شدند و به ۷ قسمت مساوی تقسیم شدند، سپس از مولدین نر، نیز به‌طور مجزا اسپرم‌گیری به‌عمل آمد. اسپرم‌گیری مستقیماً از سوراخ تناسلی مولدین نر بعد از خشک کردن اطراف سوراخ تناسلی صورت گرفت. اسپرم‌های استحصالی با هم مخلوط و به ۷ قسمت مساوی تقسیم شدند و اسپرم‌ها در یک ظرف درب دار قرار داده شد (Lasheidani *et al.*, 2008; Secer *et al.*, 2004).

سنجش پارامترهای تحرک اسپرم در نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از روش Bozkurt *et al.* (2006) و Alavi *et al.* (2009) صورت گرفت و در این خصوص پس از قرار دادن یک قطره اسپرم بر روی لام حفره‌دار، یک قطره آب جهت رقیق‌سازی و آغاز تحرک اضافه شد و مدت زمان تحرک کل با استفاده از میکروسکوپ تا متوقف شدن حرکت ۹۵ درصد سلول‌های اسپرماتوزوآ سنجیده شد.

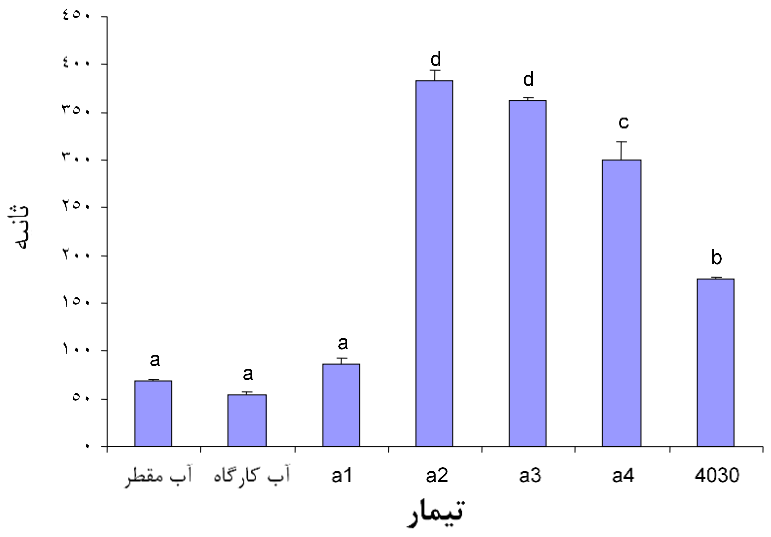
انجام لقاح به روش خشک انجام پذیرفت. پس از مخلوط کردن تخم و اسپرم مولدین جهت فعال‌سازی اسپرم‌ها، از فعال‌کننده ها با توجه تیمارهای مختلف استفاده شد و جهت رفع چسبندگی تخم ها مطابق روش Horvath *et al.* (2007) عمل شد بدین صورت که برای رفع چسبندگی تخم‌ها ۲ بار و هر بار به مدت ۲۰ ثانیه در محلول ۵ درصد اسید تانیک قرار گرفته و سپس به انکوباتور منتقل شدند. پس از گذشتن ۱۲ ساعت از لقاح، پیشرفت مراحل جنینی تخم ها محاسبه شد (Pyka *et al.*, 2001).

اطلاعات جمع‌آوری شده از بررسی‌های آزمایشگاهی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای سنجش اثر فعال‌کننده‌های نمکی و اثر آنها بر پارامترهای کیفی اسپرم از آنالیز واریانس یکطرفه استفاده گردید. جهت مقایسه میانگین‌ها از پس آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. اختلاف میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ به صورت معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Execl نسخه ۲۰۰۷ استفاده گردید.

نتایج

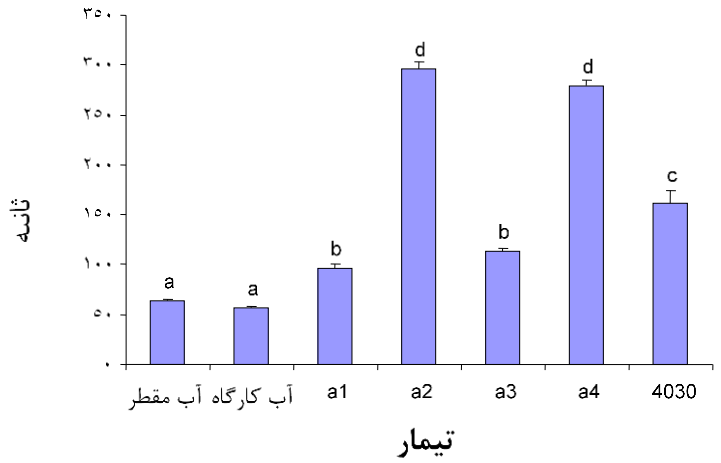
اثر محلول‌های فعال‌کننده بر میزان فعالیت اسپرم در ماهی گطان و کپور علفخوار

بر اساس شکل ۱، بیشترین میزان فعالیت و تحرک اسپرم در ماهی گطان، به‌ترتیب در محلول‌های a2، a3 و a4 و کمترین آن در آب کارگاه و آب مقطر مشاهده گردید. همچنین نتایج، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین محلول‌های a2، a3 و a4 با سایر محلول‌های به‌کار رفته در این تحقیق بود (P>۰/۰۰۱). همچنین بین محلول a3 و a4 نیز اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ مشاهده گردید. بر اساس نمودار ۲، بیشترین میزان فعالیت و تحرک اسپرم به ترتیب در محلول‌های a2، a4 و ۴۰۳۰ مشاهده گردید. به‌طوری که بین محلول‌های یاد شده و سایر محلول‌های به‌کار رفته در این تحقیق اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱ مشاهده گردید. همچنین کمترین میزان فعالیت اسپرم در آب کارگاه و آب مقطر مشاهده گردید که با سایر محلول‌ها دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱ و ۰/۰۱ بودند. محلول‌های a2، a3 و a4 و محلول ۴۰۳۰، بر میزان فعالیت اسپرم در ماهی گطان تأثیر بیشتری نسبت به ماهی کپور علفخوار داشته است، به‌طوری که باعث معنی‌دار شدن نتایج بین دو گروه ماهی شده است (P<۰/۰۱).



شکل ۱. اثر محلول‌های فعال‌کننده بر میزان فعالیت اسپرم در ماهی گطان

* وجود حروف غیرهمنام نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در بین تیمارهای آزمایشی است (p<۰/۰۱ و p<۰/۰۰۱).

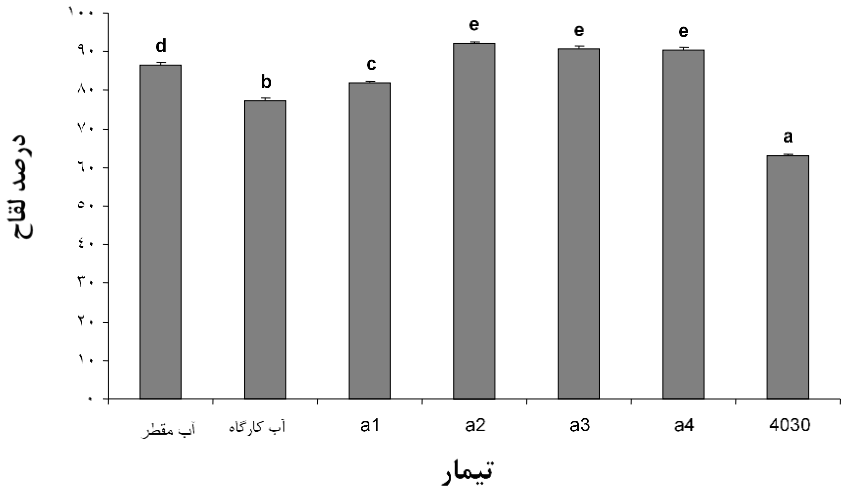


شکل ۲. اثر محلول‌های فعال‌کننده بر میزان فعالیت اسپرم در ماهی کپور علفخوار

* وجود حروف غیرهمنام نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در بین تیمارهای آزمایشی است (p<۰/۰۱ و p<۰/۰۰۱).

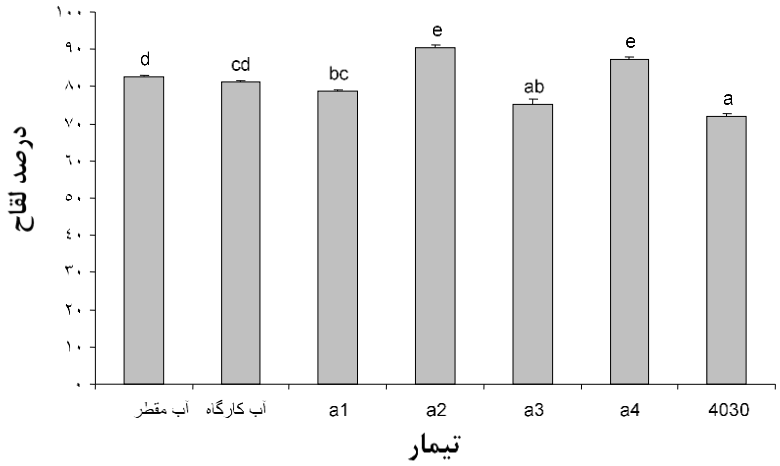
اثر محلول‌های فعال‌کننده بر میزان لقاح در ماهی گطان و کپور علفخوار

بر اساس شکل ۳، بیشترین میزان لقاح به ترتیب در محلول‌های a2، a3 و a4 و کمترین آن در محلول ۴۰۳۰ و آب کارگاه مشاهده گردید. بر اساس نتایج حاصله، بین محلول‌های a2، a3 و a4 اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). بر اساس شکل ۴، بیشترین میزان لقاح به ترتیب در محلول‌های a2 و a4 و کمترین آن در محلول‌های ۴۰۳۰ و a3 مشاهده گردید. بر اساس نتایج حاصله بین محلول‌های ۴۰۳۰ و a3 اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). محلول‌های a1، a2، a3 و a4 بر میزان لقاح در ماهی گطان تأثیر بیشتری نسبت به ماهی کپور علفخوار داشته است، به‌طوری که باعث معنی‌دار شدن نتایج بین دو گروه ماهی شده است (P>۰/۰۵).



شکل ۳. اثر محلول‌های فعال‌کننده بر میزان لقاح در ماهی گطان

* وجود حروف غیرهمنام نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در بین تیمارهای آزمایشی است (p<۰/۰۵).



شکل ٤. اثر محلول‌های فعال‌کننده بر میزان لقاح در ماهی کپور علفخوار

* وجود حروف غیرهمنام نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در بین تیمارهای آزمایشی است (p<۰/۰۵).

ارتباط بین فعالیت اسپرم و لقاح در ماهی گطان و ماهی کپور علفخوار

در ماهی گطان، بین فعالیت اسپرم و میزان لقاح در محلول a4، ارتباط معنی‌دار در سطح ۹۹٪ مشاهده گردید. با این وجود، علی رقم بالا بودن فعالیت اسپرم و میزان لقاح در ماهی گطان در مجاورت با سایر محلول‌های فعال‌کننده به‌کار رفته در این آزمایش در مقایسه با آب مقطر و آب کارگاه، هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین اثرات این محلول‌های فعال‌کننده بر میزان فعالیت اسپرم و میزان لقاح در ماهی گطان مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). همچنین در ماهی کپور علفخوار، علی رقم بالا بودن فعالیت اسپرم و میزان لقاح در ماهی کپور علفخوار در مجاورت با محلول‌های فعال‌کننده به‌کار رفته در این آزمایش در مقایسه با آب مقطر و آب کارگاه، هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری بین اثرات محلول‌های فعال‌کننده بر میزان فعالیت اسپرم و میزان لقاح در ماهی کپور علفخوار مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

بحث

همچنان که در شکل‌های ۱ و ۲ مشخص است، فعال‌کننده‌های نمکی تأثیر مناسب تری را در تداوم مدت زمان فعالیت اسپرم‌ها نسبت به گروه شاهد و آب مقطر داشتند. اسپرماتوزوآ بعد از قرارگرفتن در معرض آب، تغییرات ساختاری وخیم و وسیعی را نشان می‌دهد و به این دلیل عمر گامت‌ها در آب بسیار کوتاه است (Cosson *et al*., 1999). با استفاده از تقویت‌کننده‌ها مانند محلول‌های نمکی روی اسپرم ماهی تاس ماهی ایرانی نشان داده شده که محلول‌های فعال‌کننده نمکی باعث حفظ ساختار تاژک اسپرم می‌شود و در نتیجه مدت زمان تحرک در مقایسه با آب مقطر بالاتر می‌رود (Ahmadi *et al*., 2008).

با توجه به وجود میکروپیل بر روی تخمک، مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآ شانس رسیدن آنها را به میکروپیل زیادتر می کند. زمانی که برای فعال‌سازی اسپرم از آب استفاده شود، هم اسپرماتوزوآ و هم تخمک صدمه می‌بینند. اسپرماتوزوآ بعد از قرارگرفتن در معرض آب تغییرات ساختاری وخیم و سریعی را نشان می دهد. در تخمک سوراخ میکروپیل سریعاً به وسیله تولیدات حاصل از واکنش لایه بیرونی بسته می‌شود و به این دلیل عمر گامت‌ها در آب خیلی کوتاه است. همانند اغلب ماهیان دیگر، اسپرم در مجرای تناسلی کپور علفخوار و ماهی گطان بی‌تحرک است و وقتی که اسپرم در محیط آب شیرین قرار می‌گیرد، شروع به فعالیت می‌کند. شروع فعالیت به‌دلیل کاهش فشار اسمزی است. ساختار تاژک وقتی در آب شیرین قرار می‌گیرد به سرعت به‌هم می‌ریزد و شکل طبیعی خود را از دست می‌دهد و حرکت اسپرم بعد از ۳۰ ثانیه متوقف می‌شود. وقتی‌که رقیق‌سازی در محلول‌های نمکی صورت می‌گیرد، فشار اسمزی به اندازه‌ای تغییر می‌کند که جهت آغاز فعالیت اسپرم مناسب است و تاژک اسپرم نیز ساختار طبیعی خود را حفظ می‌نماید و حرکت سلول‌های اسپرم به‌مدت چند دقیقه به‌طول می‌انجامد. همچنین طول دوره تحرک اسپرم به ذخایر ATP نیز وابسته است و سلول‌های اسپرم زمانی که ۵۰ تا ۸۰ درصد از ذخایر ATP آنها به‌وسیله هیدرولیز مصرف شوند، از تحرک باز می ایستند (Billard *et al*., 1995). چنان‌که نتیجه گذشته نشان می‌دهند، طول دوره تحرک اسپرم و تداوم آن در رقیق‌سازی به‌وسیله فعال‌کننده‌های نمکی، به‌دلیل حفظ ساختار تاژک اسپرم و عدم تورم سلول‌ها به‌دلیل عدم شوک اسمزی به سلول‌های اسپرم و غیره، افزایش می‌یابد. با توجه به دارا بودن بیشترین میزان تحرک در اسپرم ماهی گطان در تیمارهای دارای فعال‌کننده نمکی به ترتیب به‌وسیله فعال‌کننده‌های شماره a2 وa3 و a4 و در مورد ماهی کپور علفخوار نمکی به‌ترتیب به‌وسیله فعال‌کننده‌های شماره a2 و a4 و a5 یافته‌های تحقیق حاضر با یافته‌های دیگر تحقیقات مشابه ذکر شده مطابقت دارد.

با توجه به پایین بودن میزان تحرک اسپرم به وسیله آب مقطر و آب کارگاه نسبت به سایر محلول‌های به کار گرفته شده در این پروژه، یافته‌های حاضر با تحقیقات Billard (1992) و Ahmadi *et al*. (2008) و Cosson *et al*. (1999) مطابقت دارد.

همچنین کاهش درصد سلول‌های متحرک و دوره کل تحرک اسپرم به‌دلیل مصرف بیشتر ATP و کوتاه‌تر شدن ساختار تاژک اسپرماتوزوآ در فعال‌سازی اسپرم با آب مقطر است (Perchec *et al*., 1995). یافته‌های این پژوهش نشان داد که دوره تحرک اسپرم ماهی گطان و کپور علفخوار در محلول‌های نمکی فعال‌کننده اسپرم بیشتر از آب مقطر است. در این خصوص Billard (1995) و همچنین Kalbasi & Lorestani (2006) عنوان نمودند که دوره تحرک اسپرماتوزوآ با استفاده از فعال‌کننده‌های نمکی، طولانی‌تر است و این محلول‌ها، شرایط مناسب‌تری را جهت فعالیت اسپرم ایجاد می‌نمایند.

ارزیابی تحرک اسپرماتوزوآی ماهی گطان و کپورعلفخوار، نشان داد که طول دوره تحرک آن مشابه سایر کپور ماهیان است.

نتایج این تحقیق نشان داد که پارامترهای حرکتی اسپرم ماهی گطان و کپور علفخوار وابسته به شرایط یونی و اسمزی محلول‌های فعال‌کننده اسپرم است و افزایش بیش از حد فشار اسمزی محلول‌های مورد استفاده، شرایط مشابه پلاسمای منی را ایجاد می نماید که در این حالت، کلیه پارامترهای حرکتی اسپرماتوزویید متوقف می‌شود. زمانی که اسپرماتوزوآ در ماهیان آغاز می‌گردد، این دوره کمتر از یک دقیقه به‌طول می‌انجامدکه این محدودیت زمانی، به‌دلیل تورم و تجزیه شدن اسپرماتوزوآها در محلول‌های نامناسب فعال‌کننده است (Cosson, 2004; Cosson *et al.*, 1999). در حالی‌که در آزاد ماهیان و ماهیان خاویاری، میزان بالای یون پتاسیم ممانعت‌کننده تحرک اسپرم بوده و کاهش غلظت آن، سبب آغاز فعالیت اسپرماتوزوآ می‌شود (Cosson, 2004). یون پتاسیم در کپورماهیان، سرعت و درصد تحرک سلول‌های اسپرماتوزوآ را افزایش می‌دهد و آغاز تحرک نیز با کاهش فشار اسمزی پلاسمای منی رخ می‌دهد (Billard & Cosson, 1992; Wilson-Leedy *et al.*, 2009). با توجه به اینکه محلول فعال‌کننده شماره a4 که دارای ۳۰ میلی‌مول بر کیلوگرم یون پتاسیم بوده، باعث افزایش مدت زمان تحرک اسپرم ماهی گطان و کپور علفخوار نسبت به آب کارگاه و آب مقطر بوده است.

نتایج مربوط به سطوح متفاوت یون کلسیم در فعال‌کننده‌های نمکی در تحقیق حاضر روی تحرک اسپرم ماهی گطان و کپور علفخوار مشخص نمود که بالاترین دوره تحرک در غلظت ۲/۵ میلی‌مول برلیتر مربوط به فعال‌کننده شماره a3 بوده، همچنین غلظت‌های بیشتر یون کلسیم مربوط به فعال‌کننده شماره a1 به روی مدت زمان تحرک اسپرم در ماهی گطان وکپورعلفخوار، اثر کاهنده داشته است. اثر ممانعت کنندگی یون کلسیم بر دوره تحرک در بعضی از ماهیان استخوانی دیگر نیز دیده شده است (Zuccarelli & Ingermann, 2007). همچنین نتایج این مطالعه با تحقیق Lorestani *et al.* (2012) مطابقت داشته است.

نتایج مربوط به سطوح متفاوت تریس در فعال‌کننده‌های نمکی در تحقیق حاضر روی تحرک اسپرم ماهی گطان و کپور علفخوار مشخص نمود که وجود تریس در فعال‌کننده‌های نمکی باعث افزایش مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآها نسبت فعال‌سازی به‌وسیله آب مقطر بوده است و با توجه به اینکه بیشترین دوره تحرک و همچنین لقاح در ماهی گطان و کپور علفخوار، به‌ترتیب مربوط به فعال‌کننده شماره a2 حاوی ۲۰ میلی‌مول تریس و فعال‌کننده شماره a4 حاوی ۳۰ میلی‌مول تریس بوده است و با در نظر گرفتن عدم اختلاف معنی‌دار بین فعال‌کننده شماره a2 و a4 با یکدیگر، نتایج تحقیق حاضر با تحقیق Lorestani *et al.* (2012) روی ماهی بنی و تحقیق Bastami *et al.* (2009) روی ماهی کپور معمولی مطابقت دارد.

Alavi *et al.* (2009) نیز عنوان نمودند با قرار گرفتن اسپرماتوزوآی ماهیان آب شور و شیرین، در معرض شوک اسمزی پایین (فعال‌سازی با آب مقطر) ساختار تاژک آن به شدت دستخوش تغییر می‌شود که این عامل سبب کاهش دوره تحرک و سرعت اسپرماتوزوئیدها خواهد شد. تحقیق حاضر نیز با تأیید این امر، کاهش پارامترهای حرکتی اسپرم ماهی گطان و کپور علفخوار را در آب مقطر نشان می‌دهد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که محلول فعال‌کننده نمکی شماره a2: ۵۰ mM NaCl، Tris-Hcl 20mM دارای بیشترین میزان تحرک و لقاح در ماهی گطان و کپور علفخوار بوده که با مطالعات Kalbasi & Lorestani (2006) مطابقت دارد.

محلول فعال‌کننده شماره a4 حاوی mM50NaCl، Tris-Hcl 30mM، 30mMKCl که بعد از محلول فعال‌کننده شماره دو دارای بیشترین میزان تحرک و لقاح در ماهی گطان و کپور علفخوار بوده از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با محلول شماره دو ندارد،

که در مورد این محلول یافته‌های این پژوهش با تحقیق Bastami *et al.* (2009) و Lorestani *et al.* (2012) که بیان‌کننده این مورد می‌باشند که بیشترین دوره حرکتی و درصد تحرک اسپرم به‌ترتیب در ماهی کپور دریایی و ماهی بنی مربوط به محلول نمکی حاوی ۵۰ میلی مول برلیتر کلرید سدیم و ۳۰ میلی‌مول برلیتر کلرید پتاسیم و ۳۰ میلی‌مول برلیتر تریس است، مطابقت دارد.

نتایج این تحقیق تاییدکننده نتایج Billard (1992) می‌باشد، زیرا مدت زمان تحرک اسپرم به‌وسیله فعال‌کننده‌های نمکی در مقایسه با آب بیشتر بوده و تفاوت معنی‌داری را با آن نشان می دهد. افزایش مدت زمان تحرک اسپرم شانس رسیدن اسپرم‌ها به میکروپیل و عمل لقاح را افزایش می‌دهد که نتیجه آن افزایش لقاح تخمک‌ها است، که با توجه به شکل‌های ۳ و ۴، تحقیق حاضر تاییدکننده این مطلب می‌باشد.

با توجه به اینکه درصد لقاح به‌واسطه استفاده از محلول فعال‌کننده a2 وa3 و a4 در ماهی گطان و محلول فعال‌کننده a2 و a4 در کپور علفخوار نسبت به سایر فعال‌کننده‌ها و آب مقطر و آب کارگاه، بالاتر بوده است، اما با سایر محلول‌های فعال‌کننده اختلاف معنی‌داری ندارد، بنابراین ارتباط بین تحرک اسپرم و قابلیت لقاحی به‌صورت مبهم باقی مانده است، که با یافته‌های Alavi *et al.* (2002) مطابقت دارد.

جهت حصول درصد لقاح بالا و لاروهای با کیفیت در ماهیان، دسترسی به اسپرم با کیفیت نیز ضروری بوده و از جمله فاکتورهای با اهمیت در خصوص کسب لقاح مصنوعی با کارایی بالا تلقی می‌گردد (Verma *et al.*, 2009; Secer *et al.*, 2004).

با توجه به اینکه مشخص شده که خصوصیاتی مثل غلظت اسپرم، تحرک اسپرم و ترکیبات پلاسمای منی می‌توانند کیفیت اسپرم را تحت تأثیر قرار دهند (Billard, 1992)، بنابراین شاید میزان تحرک که خود تنها یکی از دلایل کیفی اسپرم جهت بالا رفتن درصد لقاح می‌باشد، جهت رسیدن به این مهم کفایت نکند.

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس نتایج حاصله می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که محلول‌های نمکی به‌کار رفته در این تحقیق توانستند تحرک اسپرم را در تیمارهای مختلف افزایش دهند که این افزایش تحرک اسپرم در مرحله بعدی باعث افزایش درصد لقاح گردید. همچنین در بین فعال‌کننده‌های نمکی به‌کار رفته در این تحقیق، محلول فعال‌کننده a2، بیشترین میزان تأثیر را بر میزان تحرک اسپرم و میزان موفقیت لقاح، در هر دو ماهی گطان و کپور علفخوار، نشان داد. همچنین در بین دو ماهی تحت آزمایش در این تحقیق، اثر فعال‌کننده‌های نمکی بر ماهی گطان بیشتر از ماهی کپور علفخوار بوده است به‌طوری که باعث افزایش حدوداً ۷ برابری در میزان تحرک اسپرم و افزایش ۲۰ درصدی در میزان لقاح تخم گردیده است.

سپاسگزاری

لازم است مراتب قدردانی و سپاس خود را از پرسنل و مدیریت محترم مرکز تکثیر و توسعه ماهیان بومی سوسنگرد و اداره کل شیلات خوزستان به سبب همکاری و در اختیار قرار دادن امکانات اجرایی و حسن توجه در طول این پروژه تحقیقاتی اعلام داریم. همچنین از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر جهت تأمین هزینه‌های مالی این پروژه تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Ahamdi, M.R.; Kalbasi, M.R.; Hosseini, Sh.B.; Lorestani, R.; (2008). Assessment of sperm concentration, effects of activating agents and pH on activation of sperm in *Cyprinus Carpio*. Journal of Marine Science

and Technology; 7(1): 13-21.

2. Alavi, S.M.H.; Majazi Amiri, B.; Cosson, J.; Pourkazemi, M.; Karami, M.; (2002). Primary study on activation of spermatozoids of Iranian sturgeon. Comparison study in fresh water and saline solutions in different dilutions, 2nd national and regional congress of Sturgeon fishes, Abstract book, 128-130.
3. Alavi, S.; Rodina, M.; Policar, T.; Linhart, O.; (2009). Relationship between semen characteristics and body size in *Barbus barbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology; 153: 430-437.
4. Bastami, K.D.; Imanpour, M.R.; Hoseinifar, S.H.; (2009). Sperm of feral carp *Cyprinus carpio*: optimization of activation solution. Aquaculture International; 18: 771-776.
5. Billard, R.; (1992). Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. Aquaculture; 100: 263-298.
6. Billard, R.; Cosson, J.; Perchec, G.; Linhart, O.; (1995). Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture; 129: 95-112.
7. 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.
8. Bozkurt, Y.; (2006). The relationship between body condition, sperm quality parameters and fertilization success in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Animal and Veterinary Advances; 5: 284-288.
9. Caille, N.; Rodina, M.; Kocour, M.; Gela, D.; Flajšhans, M.; Linhart, O.; (2006). Quantity, motility and fertility of tench *Tinca tinca* (L.) sperm in relation to LHRH analogue and carp pituitary treatments. Aquaculture International; 14: 75-87.
10. Cejko, B.I.; Kucharczyk, D.; Targońska, K.; Kubiak, D.; Sarosiek, B.; Glogowski, J.; (2008). Quality parameters and selected biochemical markers of asp, *Aspius aspius* (L.), semen obtained after hormonal stimulation with Ovaprim or Ovopel. Archives of Polish Fisheries; 16: 179-188.
11. Cosson, J.; Billard, R.; Gibert, C.; Dreanno, C.; 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.
12. Cosson, J.; (2004). The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. Aquaculture International; 12: 69-85.
13. Eskandari, Gh.; Safikhani, H.; Dehghan, S.; Amirinia, S.; Esmaeili, F.; Mayahi, Y.; Shakiba, Gh.; Kor, D.; (1998). Study of biology of *Barbus xanthopeterus* in south of Karkheh river and Horolazim in Khoozestan Privince. Research Report, Iranian Fisheries research Institution, pp: 91.
14. Farid Pak, F.; (2007). Executive guidelines of propagation and culture of warm waters fishes. 5th Edition, Abzian Scientific Publications, pp: 305.
15. Fricke, R.; Bilecenoglu, M.; Sari, H.M.; (2007). Annotated checklist of fish and lamprey species (Gnathostoma and

Petromyzontomorphi) of Turkey, including a Red List of threatened and declining species. Stuttgarter Beitr. Naturk. Sea A; 706: 1-172.

16. Hatef, A.; Niksirat, H.; Amiri, B.M.; Alavi, S.M.H.; Karami, M.; (2007). Sperm density, seminal plasma composition and their physiological relationship in the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). Aquaculture Research; 38: 1175-1181.
17. Horvath, Á.; Miskolczi, E.; Mihalffy, S.; Osz, K.; Szabo, K.; Urbanyi, B.; (2007). Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. Cryobiology; 54: 251-257.
18. Kalbasi, M.; Lorestani, R.; (2006). Effects of different diluents on sperm activation period of rainbow trout. Journal of agricultural sciences and natural resources, pp: 132-142.
19. Khajeh, Gh.H.; Mesbah, M.; Peighan, R.; (2007). Comparative study of some serum biochemical parameters of *Barbus sharpeyi* and *Ctenopharyngodon idella*. Iranian Veterinary Journal; 3(4): 14-22.
20. Lasheidani, M.; Balouchi, S.; Keyvan, A.; Jamili, S.; Falakrou, K.; (2008). Effects of Butachlor on Density, Volume and Number of Abnormal Sperms in Caspian Kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamenskii 1901). Research Journal of Environmental Sciences; 2: 474-482.
21. Lorestani, R.; Kalbasi, M.R.; Maremazi, J.Gh.; (2012). Determination of optimum Ionic and Osmotic conditions for activation of spermatozoid of *Barbus shapeyi*, Journal of Oceanography; 3(10): 69-79.
22. Metwally, M.; Fouad, I.; (2008). Some Biochemical Changes Associated with Injection of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) with Oviaprim and Pregnyl for Induction of Artificial Spawning. Global Veterinaria; 2: 320-326.
23. Mikolajczyk, T.; Chyb, J.; Szczerbik, P.; Sokolowska-Mikolajczyk, M.; Epler, P.; Enright, W.J.; Filipiak, M.; Breton, B.; (2004). Evaluation of the potency of azagly nafarelin (GnRH analogue), administered in combination with different formulations of pimozide, on LH secretion, ovulation and egg quality in common carp (*Cyprinus carpio* L.) under laboratory, commercial hatchery and natural conditions. Aquaculture; 234: 447-460.
24. Mortazavi Zadeh, S.A.; Moazedi, M.; Sharifian, M.; Basak Kahkesh, F.; (2005). Study of possibility of artificial propagation of *Barbus xanthopeterus*, Research Report, Iranian Fisheries research Institution, pp: 34.
25. Najaf Pour, N.; Almokhtar, M.; Nikpey, M.; Eskandari, Gh.; Mayahi, Y.; Shakiba, Gh.; (1997). Identification of some fresh water fishes of Khoozestan province. Research Report, Iranian Fisheries research Institution, pp: 91.
26. Pavlov, D.; (2006). A method for the assessment of sperm quality in fish. Journal of Ichthyology; 46: 391-398.
27. Perchec, G.; Jeulin, C.; Cosson, J.; Andre, F.; Billard, R.; (1995). Relationship between sperm ATP content and motility of carp

spermatozoa. Journal of Cell Science; 108: 747-753.

28. Pyka, J.; Bartel, R.; Szczerbowski, J.A.; Epler, P.; (2001). Reproduction of gattan (*Barbus xanthopterus* Heckel), shabbout (*Barbus grypus* Heckel), and bunni (*Barbus sharpeyi* Gunther) and rearing stocking material of these species. Arch. Pol. Fish.; 9: 235-246.
29. Secer, S.; Tekin, N.; Bozkurt, Y.; Bukan, N.; Akcay, E.; (2004). Correlation between biochemical and spermatological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh; 56(4): 274-280.
30. Verma, D.; Routray, P.; Dash, C.; Dasgupta, S.; Jena, J.; (2009). Physical and biochemical characteristics of semen and ultrastructure of spermatozoa in six carp species. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences; 9: 67-76.
31. Warnecke, D.; Pluta, H.J.; (2003). Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. Aquaculture; 215: 167-185.
32. Wilson-Leedy, J.; Kanuga, M.; Ingermann, R.; (2009). Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. Theriogenology; 71: 1054-1062.
33. Yousefian, M.; Gezel, H.G.; Masoud, H.F.; (2008). Induction of ovulation in endemic *Chalcarburnus chalcoides*, living in the Caspian Sea, using LRH-Aa combined with metoclopramide. African Journal of Biotechnology; 7.
34. Zuccarelli, M.D.; Ingermann, R.L.; (2007). Calcium-induced quiescence of sperm motility in the bluegill (*Lepomis macrochirus*). Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology; 307: 590-599.