جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۷، دوره ۶۳، شماره ۵، ۳۵۰-۳۴۵

# بررسی اثر متقابل سن مولدین نر و محلول‌های فعال کننده اسپرم بر میزان چشم زدگی تخم قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

رضا لرستانی[۱] محمد رضا احمدی[۲]* محمد رضا کلباسی[۳]

۱) فارغ التحصیل کارشناسی ارشد شیلات دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران-ایران.
۲) گروه بهداشت و بیماری های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران.
۳) گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس، تهران-ایران.

(دریافت مقاله: ۲۲ آذر ماه ۱۳۸۵، پذیرش نهایی: ۱۲ اردیبهشت ماه ۱۳۸۶)

## چکیده

**اثرات متقابل سه کلاسه سنی مولدین نر و دو محلول فعال کننده اسپرم و آب مقطر بر مدت زمان تحرک اسپرم و میزان چشم زدگی تخم ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد بررسی قرار گرفت. در آب مقطر تفاوتی از نظر فعال نمودن اسپرم در گروه‌های سنی مختلف مشاهده نشد. در فعال کننده ۱، بیشترین مدت زمان تحرک اسپرم، در سن $3^+$ سالگی (۹۸/۴ ثانیه) بود که با دو سن دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. در فعال کننده ۲، سن $3^+$ ساله بالاترین مدت زمان تحرک را نشان داد (۹۶/۲ ثانیه) که با سن $2^+$ و $4^+$ سالگی اختلاف معنی‌داری داشته و مولدین $2^+$ ساله کمترین مدت زمان تحرک را در این فعال کننده نشان دادند. مولدین دو ساله بیشترین میزان چشم زدگی را در مقایسه با سایرین نشان دادند (۸۶/۸ درصد) که با گروه‌های دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. رقیق‌سازی اسپرم مولدین در سن $2^+$ سالگی توسط فعال کننده ۱ موجب بالاترین میزان چشم زدگی گردید که اختلاف معنی‌داری نسبت به دو گروه سنی دیگر داشت. رقیق‌سازی اسپرم توسط فعال کننده ۲ بالاترین میزان چشم زدگی تخم‌ها را در سن‌های $2^+$ و $3^+$ سالگی نشان داد.**

**واژه‌های کلیدی:** سن، فعال کننده اسپرم، تخم چشم زده، قزل آلای رنگین کمان.

## مقدمه

مطالعات متعددی در خصوص ویژگی‌های اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان که واجد اهمیت آبزی پروری فراوانی است به عمل آمده است (۷،۹). در این ماهی خصوصیاتی از قبیل غلظت اسپرم، تحرک اسپرم، ترکیبات پلاسمای منی(۱) و اسپرماتوکریت(۸) کیفیت اسپرم را تحت تأثیر قرار می‌دهند که خود نیز تحت تاثیر سن مولد نر می‌باشند، بنابراین کیفیت منی از فاکتورهایی است که می‌تواند میزان لقاح را تحت تأثیر قرار دهد و می‌توان از آن به عنوان عامل مؤثر باروری تخمک‌ها نام برد (۱،۱۱).

ارتباط بین طول دوره تحرک اسپرم و قابلیت آن جهت انجام لقاح بصورت مبهم باقی مانده اما یک رابطه مثبت در مراکز تکثیر ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بین طول دوره تحرک اسپرم و درصد لقاح وجود دارد(۱۳) زیرا مدت زمان تحرک اسپرم نشان دهنده زمان لازم برای عمل لقاح می‌باشد و اطلاع از رفتارهای حرکتی اسپرم در محلول‌های فعال کننده اسپرم برای طولانی کردن، پایدار نمودن و تداوم بخشیدن تحرک اسپرم ضروری است. غلظت اسپرم در منی یکی از فاکتورهای مهم در تعیین کیفیت منی می‌باشد، اما هنوز رابطه آن با دیگر فاکتورهای کیفی منی همانند تحرک و قابلیت لقاحی اسپرم به درستی مشخص نشده است(۳).

اثر سن مولد نر، حضور مولد ماده در کنار مولد نر، غلظت و تحرک اسپرم بر روی کارایی لقاح آزمایشگاهی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در سال ۲۰۰۲ بوسیله Liley و همکاران بررسی شد. نتایج مشخص نمود که غلظت اسپرم، در مایع اسپرمی ماهیان نری که برای اولین بار اسپرم دهی می‌کنند (۱ ساله) در مقایسه با ماهیان نر ۳ ساله، بالاتر می‌باشد، اگر چه مدت زمان تحرک در هر دو گروه مولد نر ذکر شده مشابه بود، اما این مدت زمان در دفعات مختلف نمونه‌گیری‌ها در طول فصل، روند افزایشی داشته است. همچنین زمانی که ۲۰ ثانیه یا بیشتر اسپرم یا تخمک با آب تماس پیدا کند، و بعد از آن لقاح صورت گیرد، کاهش سریعی در میزان لقاح مشاهده می‌گردد.

اثر سن بر روی خصوصیات اسپرم در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در سال ۲۰۰۳ توسط Tekin و همکاران بررسی شد. نتایج این تحقیق مبین این مطلب بود که خصوصیات اسپرمی از قبیل حجم اسپرم تولید شده در هر سن به همراه مایع منی، میزان تحرک، مدت زمان فعالیت اسپرم، غلظت، تعداد کل اسپرماتوزوآ و pH در رده‌های سنی مختلف دارای تغییرات زیادی می‌باشد، بدین صورت که با افزایش سن، حجم اسپرم تولید شده در هر سن به همراه مایع منی، تحرک اسپرم، مدت زمان فعالیت اسپرم و تعداد کل اسپرماتوزوآ افزایش یافته ولی غلظت در آنها کاهش می‌یابد. همچنین رابطه مثبتی بین وزن بدن و طول ماهی با حجم اسپرم تولید شده به همراه مایع منی وجود دارد که این رابطه با غلظت منی بصورت منفی می‌باشد.

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر سن مولدین نر در سه کلاسه سنی $2^+$، $3^+$ و $4^+$ ساله، همچنین تعیین میزان موفقیت چشم‌زدگی تخم‌ها به عنوان فاکتوری دقیق برای سنجش میزان لقاح تخمک‌ها(۱) با استفاده از فعال کننده‌های نمکی بجای آب معمولی و بررسی خصوصیات اسپرم منجمله مدت زمان تحرک در تکثیر ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌باشد.

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۹۲-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email :mahmadi@ ut.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



## مواد و روش کار

تحقیق حاضر در آبان ماه سال ۱۳۸۲ و در مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت انجام گرفت. در ابتدا آماده سازی محلول های فعال کننده متفاوت، و از مواد آزمایشگاهی خالص محلول ۱ (بر حسب گرم در لیتر) حاوی [(۵/۵۴=، Tris=۲/۴۲Nacl، =۳/۵۷، pH=۸/۴Glycin)، (۷)] و محلول ۲ (بر حسب گرم در لیتر) حاوی [(Nacl=۷/۳۰۵، =./۷۳۵، $2H_2o$، pH=۷/۷$Cacl_2$)، (۸)] صورت پذیرفت. درجه حرارت آب کارگاه ۸ درجه سانتیگراد با منشایی از آب چشمه و رود خانه بود و بدین منظور فعال کننده ها و ۱ لیتر آب مقطر به عنوان گروه شاهد، درون ظروف یکبار مصرف تمیز قرار داده و تا همدما شدن آنها با آب کارگاه، در آن نگهداری شدند.

جداسازی و انتخاب مولدین نر در ابتدای فصل تکثیر قزل آلای رنگین کمان صورت گرفت. با توجه به اینکه سن های مختلف ماهی نر قزل آلای رنگین کمان در استخرهای جداگانه نگهداری می شوند، انتخاب اولیه ماهی در ۳ سطح سنی ذکر شده، بوسیله ساچوک و به طور تصادفی در استخرهای مختلف صورت گرفت. در هر سطح سنی ۵ مولد نر انتخاب شده و از مولدین جهت اطمینان بیشتر تعیین سن با فلس صورت گرفت (۱۴). طول مولدین $۲^+$ ساله، ۲±۳۵ سانتی متر و وزن آنها ۲۰±۹۵۰ گرم بود، این میزان در مولدین $۳^+$ ساله، ۱/۵±۴۲ سانتی متر و وزن آنها ۲۵±۱۳۵۰ گرم و در مولدین $۴^+$ ساله، ۳±۴۶ سانتی متر و وزن آنها ۳۰±۱۸۵۰ گرم بود. جهت انجام عملیات تکثیر از ۸ ماهی ماده و ۱۵ ماهی نر استفاده گردید. در ابتدا ماهی های ماده را بوسیله ماده $MS_{222}$ بیهوش نموده و تخمک های مورد نیاز جهت لقاح تهیه گردید. جهت یکسان شدن شرایط تکثیر برای تمام تیمارها تخمک های استحصال شده از ماهیان ماده مخلوط شدند (۱۳). در هر سطح سنی، از ۵ مولد نر انتخاب شده، بصورت جداگانه استحصال اسپرم صورت گرفت و اسپرم ها در ۵ پلیت جداگانه نگهداری شدند. سپس از هر پلیت ۴ سی سی اسپرم برداشته و با هم مخلوط گردید. بعد از مخلوط نمودن اسپرم ها بصورت جداگانه در هر رده سنی، پلیت های C,B,A حاصل شد که پلیت A مخلوط اسپرم مولدین نر $۲^+$ ساله، پلیت B مخلوط اسپرم مولدین نر $۳^+$ ساله و پلیت C مخلوط اسپرم مولدین نر $۴^+$ ساله بود. پلیت های حاوی اسپرم ها به همراه مخلوط تخمک های استحصال شده از مولدین ماده درون یونولیتی که کف آن پودر یخ (جهت حفاظت از گامت ها) بود، قرار گرفتند و به سالن تکثیر انتقال یافتند. در هر یک از سطوح سنی $۲^+$، $۳^+$ و $۴^+$، ۹ لقاح در سه تیمار، آب به عنوان گروه شاهد و فعال کننده ۱ و ۲ بعنوان تیمارها، صورت که در سه سطح سنی، مجموعا ۹ تیمار و ۳ تکرار در هر تیمار انجام شد. در هر سطح سنی و در هر لقاح به عنوان هر تکرار، جهت فعال سازی اسپرم آنها و انجام لقاح، در یک دسته تخمک ۵۰ میلی لیتری توسط پیمانه از تخمک های مخلوط شده مولدین ماده جدا گردید و با استفاده از تنظیف، مایع سلومیک از تخمک ها جدا گردید. جداسازی مایع سلومیک جهت جلوگیری از خطا صورت گرفت زیرا مایع سلومیک خود یک تقویت کننده و فعال کننده اسپرم می باشد (۴).

سپس هر دسته تخمک را جداگانه در ظروف پلاستیکی متوسط قرار داده و برای هر ظرف، ۵/. میلی لیتر اسپرم از پلیت مربوطه را با استفاده از میکروپیپت برداشته و با تخمک ها کاملا مخلوط گردید. به منظور فعال سازی اسپرم و انجام عمل لقاح، ۵ میلی لیتر مایع فعال کننده (آب مقطر، فعال کننده ۱ یا ۲) به هر ظرف اضافه و به مدت ۲ دقیقه کاملا مخلوط شده، تا لقاح کامل گردد. سپس جهت حذف اسپرم های اضافه و پوسته ها، تخم های موجود در هر ظرف به دقت شستشو شدند. در مرحله بعد یک تراف آبگیری و جریان ملایمی از آب در آن ایجاد شد. تخمک های لقاح یافته موجود در ظروف پلاستیکی بعد از شستشو، در آبکش هایی که قبلا شماره گذاری شده بودند قرار گرفته و جهت جذب آب به مدت ۵/. ساعت در تراف قرار گرفتند (شرایط معمول کارگاه). جهت انجام لقاح با فعال کننده ۱ و فعال کننده ۲ مراحل بالا دقیقا تکرار گردید با این تفاوت که در بالا (گروه شاهد) جهت فعال سازی اسپرم یا تکمیل لقاح از آب استفاده شد. به منظور سنجش مدت زمان تحرک اسپرم در سطوح سنی متفاوت، از اسپرم های مولدین نر در سطوح سنی متفاوت استفاده شد. بدین منظور جهت سنجش تاثیر محلول های فعال کننده متفاوت بر مدت زمان تحرک اسپرم، یک قطره اسپرم را روی لام در زیر میکروسکوپ قرار داده و یک قطره محلول فعال کننده (آب مقطر، فعال کننده ۱ یا ۲) را با آن مخلوط نموده و مدت زمان تحرک اسپرم بلافاصله پس از آغاز تحرک، با استفاده از کرنومتر ثبت گردید. مدت زمان تحرک اسپرم تا زمانی که تحرک ۹۹ الی ۹۵ درصد سلول ها متوقف شوند در نظر گرفته شد (۱،۴،۱۰،۱۲). برای ارزیابی غلظت اسپرم مولدین، با لوله میکروهماتوکریت از اسپرم مولدین نمونه برداری صورت گرفت (۱،۱۵،۲۰). سپس نمونه ها بوسیله دستگاه میکروسانتریفیوژ (۱،۱۲،۱۵) به مدت ۵ دقیقه و با دور ۲۰۰۰g سانتریفیوژ شدند (۲۱). با توجه به درجه حرارت آب، حدود ۱۹ روز پس از لقاح، با روش شوک دهی (۱)، تخم های چشم زده از تخم های تلف شده مشخص گردیدند. بدین منظور پس از خروج محتوی تخم ها بوسیله سیفون از داخل سینی های درون تراف، تخم ها را از فاصله ۲۰ سانتی متری در سینی دیگری تخلیه کرده، طی این عمل تخم های لقاح نیافته یا تلف شده، سفید گردیده و تغییر رنگ می دهند. تخم های تلف شده با استفاده از پوآر جمع آوری و مورد شمارش قرار گرفتند. تخم های چشم زده نیز در این مرحله بدقت شمارش و میزان بازماندگی تخم ها تا مرحله چشم زدگی از طریق رابطه ذیل محاسبه و ثبت می گردید.

$$\text{میزان چشم زدگی} = \frac{\text{تعداد تخمک های چشم زده}}{\text{تعداد تخمک های لقاح یافته}} \times ۱۰۰$$

**تجزیه و تحلیل آماری:** اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار spss و به شرح زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. ابتدا تایید نرمال بودن داده ها توسط آزمون کولموگراف اسمیرنف صورت گرفت. داده هایی که نرمال نبودند با روش های معمول نرمال گشتند. جهت تعیین اختلاف اثر متقابل سن و محلول های متفاوت فعال کننده بر میزان چشم زدگی، مدت

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



زمان تحرک اسپرم درمولدین نر $^{+}$۲، $^{+}$۳ و $^{+}$۴ ساله از آنالیز واریانس دو طرفه استفاده گردید. جهت سنجش اختلاف بین غلظت اسپرم مولدین از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۹۵درصد استفاده گردید.

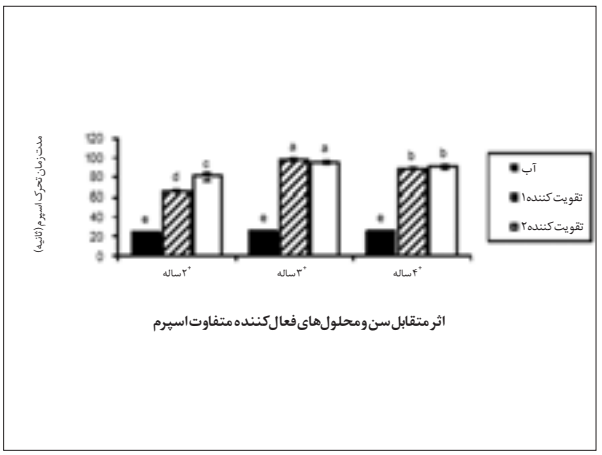
## نتایج

نتایج نشان داد که در سن $^{+}$۲ سالگی، تحرک اسپرم در حضور فعال کننده ۲، بیشترین میزان (۳/۹۲±۸۱/۶۶ثانیه) و در حضور آب کمترین مقدار (۰/۴۷±۲۴/۸۶ثانیه) است($p\geq۰/۰۵$). در این سن فعال کننده ۱ (۱/۵±۶۶/۶۶ثانیه) مدت زمان حد واسط فعال کننده ۲ و آب را دارا می‌باشد. در سن $^{+}$۳ سالگی تفاوت معنی‌داری در مدت زمان تحرک اسپرم حاصل از فعال کننده ۱ (۱/۱۲±۹۸/۴ثانیه) و ۲ (۰/۸۶±۹۶/۲ثانیه) وجود ندارد($p\geq۰/۰۵$). اما این دو فعال کننده تفاوت معنی‌داری را با مدت زمان تحرک اسپرم ایجاد شده توسط آب (۰/۲۴±۲۶/۴ثانیه) در این سن را دارند. بین مدت زمان تحرک اسپرم در سن $^{+}$۴ سالگی در فعال کننده‌های ۱ (۱/۱±۸۹/۲۵ثانیه) و ۲ (۱/۴۳±۹۱/۷۵ثانیه) اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌گردد اما این دو فعال کننده اختلاف معنی‌داری با فعال سازی توسط آب (۰/۲۶±۲۶/۵ثانیه) را در این سن نشان می‌دهند. فعال سازی اسپرم با محلول‌های فعال کننده ۱ و ۲ در سن $^{+}$۳ سالگی، بالاترین مدت زمان تحرک در مقایسه با دیگر سن‌ها و فعال کننده‌ها را نشان می‌دهد ($p=۰/۰۰۱$) در حالی که در سطح ۹۵درصد اختلاف معنی‌داری بین این دو فعال کننده در این سن دیده نمی‌شود (نمودار ۱). اثر متقابل فعال کننده ۱ و ۲ با سن $^{+}$۳ سالگی در مقایسه با اثر متقابل این دو فعال کننده با سن $^{+}$۴ سالگی اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد($p\leq۰/۰۵$) (نمودار ۱) بدین صورت که مدت زمان تحرک اسپرم در سن $^{+}$۳ سالگی و در حضور فعال کننده‌های ۱ و ۲ بالاتر از مدت زمان تحرک اسپرم در سن $^{+}$۴ سالگی و در حضور فعال کننده‌های ۱ و ۲ می‌باشد. محلول‌های فعال کننده ۱ و ۲ در سن $^{+}$۴ سالگی نیز با فعال کننده ۱ و ۲ در سن $^{+}$۲ سالگی تفاوت معنی‌داری را در سطح ۹۵درصد نشان می‌دهد (نمودار ۱). نتایج آزمون دانکن در مورد اثر متقابل سن و محلول‌های فعال کننده اسپرم بر میزان چشم زدگی تخم‌ها نشان می‌دهد که در سن $^{+}$۲ سالگی، هر سه نوع فعال کننده اسپرم با هم اختلاف معنی داری نداشته ($p\geq۰/۰۵$) و فعال کننده ۲ (۲/۳۳±۸۶/۱۱درصد) در سن $^{+}$۳ سالگی بیشترین میزان چشم زدگی را در بین تیمارها دارا می‌باشد ($p=۰/۰۱$) و در سن $^{+}$۴ سالگی و با استفاده از فعال کننده ۱ (۱/۰۸±۷۶/۴۵درصد) کمترین میزان چشم‌زدگی مشاهده می‌شود (نمودار ۲). در سن $^{+}$۳ سالگی، در استفاده از فعال کننده ۲ بیشترین میزان چشم زدگی و آب پایین ترین میزان چشم‌زدگی (۰/۶۷±۷۸/۶۲درصد) را نشان دادند. در سن $^{+}$۴ سالگی آب بالاترین میزان چشم‌زدگی (۲/۱±۸۳/۰۴درصد) و در فعال کننده ۱، پایین‌ترین میزان چشم‌زدگی (۱/۰۸±۷۶/۴۵درصد) مشاهده گردید (نمودار ۲). غلظت اسپرم مولدین نر $^{+}$۲ ساله (۲/۲۷±۳۱/۵درصد) اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با مولدین نر $^{+}$۳ ساله (۱/۷۹±۲۱/۴۲درصد) نشان می‌دهند($p\leq۰/۰۵$) در حالی که این میزان در مولدین نر $^{+}$۴ ساله (۱/۳±۲۵/۶۸درصد) تفاوت معنی‌داری را با مولدین نر $^{+}$۲ و $^{+}$۳ ساله نشان نمی دهد($p\geq۰/۰۵$) و بین این دو سن قرار می‌گیرد (نمودار ۳).

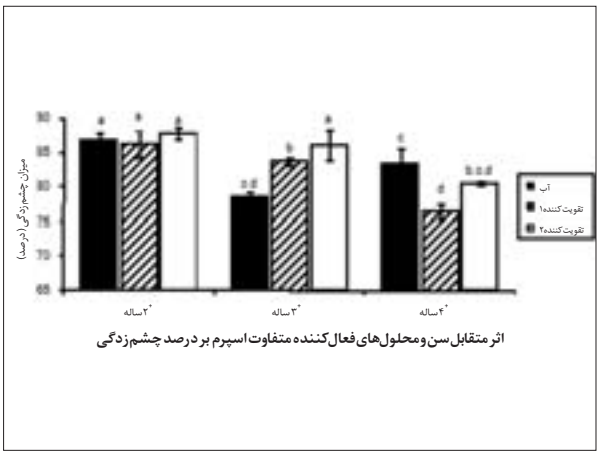
## بحث

فعال کننده‌های ۱ و ۲ بهترین تاثیر را بر تداوم دوره تحرک اسپرم مولدین سن $^{+}$۳ سالگی که رقیق ترین اسپرم را دارد، نشان داده است (نمودار ۱). با افزایش غلظت اسپرم، در سن $^{+}$۲ سالگی، مشاهده می‌شود که مدت زمان تحرک در فعال کننده ۱ پایین تر از فعال کننده ۲ می‌باشد. ولی در رده‌های سنی متفاوت، فعال کننده ۱ و ۲ عملکرد مناسب تری را جهت طولانی نمودن مدت زمان تحرک اسپرم در مقایسه با گروه شاهد نشان داده‌اند (نمودار ۱). بالاترین مدت زمان تحرک در سن $^{+}$۳ سالگی مشاهده می‌شود که می تواند به دلیل کاهش سلول‌های اسپرم در واحد حجم باشد. همچنان که در نتایج این تحقیق مشاهده می‌شود، با کاهش غلظت اسپرم در سن‌های متفاوت، افزایش مدت زمان تحرک به تبع آن دیده می‌شود. با ایجاد تغییرات در pH، فشار اسمزی، ترکیب هر یک از کاتیون‌ها به تنهایی یا به حالت ترکیبی و افزایش ATP می‌توان سبب افزایش تحرک اسپرم شد(۲۲). pH محلول‌های فعال کننده فاکتور مهمی برای طولانی نمودن تحرک اسپرم ماهیان می‌باشد، اما بهترین pH محلول فعال کننده در ماهیان مختلف متفاوت بوده و در ارتباط با pH پلاسمای منی می‌باشد(۲،۳). به نظر می‌رسد شرایط قلیایی محلول‌های رقیق کننده، مانند شرایط pH پلاسمای منی و مایع شکمی ماهی، افزایش تحرک اسپرم را در ماهیان آب شیرین به دنبال داشته باشد (۱۸). نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان می‌دهد که با ایجاد تغییر در pH و ترکیب یونی محلول‌های فعال کننده ۱ و ۲ شرایط مساعدتر تحرک اسپرم در حضور آنها در مقایسه با گروه شاهد فراهم آمده است.

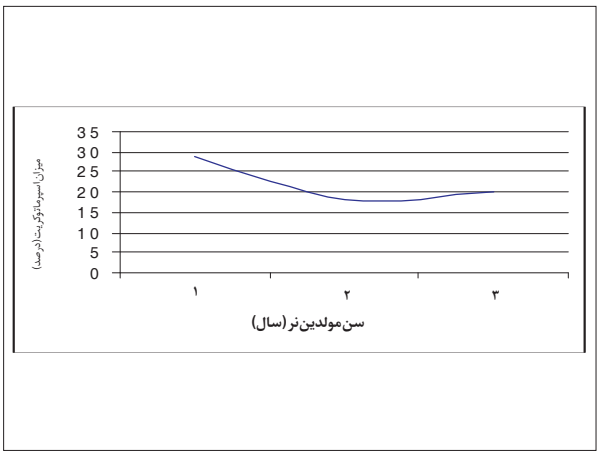
نتایج تحقیق فوق همچنان گویای آن است که در سن $^{+}$۳ سالگی فعال کننده ۱ و ۲ اختلاف معنی‌داری را در میزان چشم زدگی، در مقایسه با گروه شاهد نشان می‌دهد (نمودار ۲). همانگونه که در قبل هم اشاره شد، هرگاه غلظت اسپرم کاهش یابد، افزایش مدت زمان تحرک اسپرم که نشان دهنده زمان لازم برای انجام عمل لقاح است(۳) می‌تواند اثرات کاهش غلظت اسپرم را جبران کند(۵). ارتباط بین غلظت اسپرم و مدت زمان تحرک فوق می‌تواند به صورت یک رابطه دو طرفه باشد. از آنجا که مدت زمان تحرک اسپرم در آزاد ماهیان کوتاه است و کل مدت زمان تحرک آن در حضور آب کمتر از ۳۰ ثانیه می‌باشد(۶) پس افزایش مدت زمان تحرک اسپرم، شانس رسیدن اسپرماتوزوآها به میکروپیل و انجام فرآیند لقاح را بیشتر می‌کند که نتیجه آن افزایش میزان لقاح و افزایش رسیدن تخمک‌ها به مرحله چشم‌زدگی می‌باشد. Billard در سال ۱۹۹۲ گزارش نمود که ۱۰۰درصد سلول‌های اسپرم قزل‌آلا در حضور فعال کننده ۲ تحرک دارند. تحرک کل اسپرم‌ها در این فعال




**نمودار۱-** اثر متقابل سن و محلول‌های فعال کننده بر مدت زمان تحرک.




**نمودار۲-** اثر متقابل سن و محلول‌های فعال کننده بر میزان چشم‌زدگی.




**نمودار۳-** تغییرات غلظت اسپرم (درصد اسپرماتوکریت) سن‌های متفاوت.

کننده در مقایسه با گروه شاهد می‌تواند دلیل دیگری برای افزایش میزان چشم‌زدگی در این سن باشد. در مولدین $۴^+$ ساله و در فعال کننده‌های ۱ و ۲ کاهش میزان چشم‌زدگی در مقایسه با گروه شاهد دیده می‌شود در حالی که فعال کننده ۲ در مقایسه با فعال کننده ۱ همچنان میزان چشم‌زدگی بالاتری را نشان می‌دهد (نمودار ۲). کاهش میزان چشم‌زدگی در این سن شاید بدلیل ارتباط متقابل و منفی فعال کننده‌ها و ترکیبات مایع منی در این سن باشد. عمل و عکس العمل‌های ترکیبات یونی در پلاسمای منی از طریق تنظیم ترکیبات یونی داخل سلولی و یا تغییرات فشار اسمزی داخل و بیرون سلولی، نه تنها در مکانیزم‌های شروع تحرک اسپرم، بلکه در تنظیم فعالیت اسپرم و الگوی رفتاری بعد از شروع فعالیت نقش دارند. تحقیقات اخیر بر روی چگونگی این ارتباطات، نشان دهنده حساسیت زیستی اسپرماتوزوآی ماهیان به مقدار غلظت یون‌های موجود در پلاسمای منی می‌باشد(۱۰). از طرفی کیفیت اسپرم در ماهیان به سن، عوامل ژنتیکی و محیطی و فیزیولوژی در جنس نر مرتبط می‌باشد(۱۷،۱۶). پس این امکان نیز وجود دارد که ارتباط متقابل کیفیت اسپرم و ترکیبات پلاسمای منی در سن $۴^+$ سالگی با ترکیبات فعال کننده‌ها به گونه‌ای باشد که اثرات منفی را به دنبال داشته که نتیجه آن را می‌توان در کاهش میزان چشم زدگی مشاهده نمود. در سن $۲^+$ سالگی میزان چشم‌زدگی در فعال کننده‌های ۱ و ۲ در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (نمودار ۲) اگر چه از لحاظ عددی میزان تقویت کننده ۲ بالاتر از گروه شاهد می‌باشد. شاید بتوان علت عدم مشاهده اختلاف معنی‌دار بین فعال کننده‌ها در مقایسه با گروه شاهد را در میزان بالای اسپرماتوکریت در این سن جستجو نمود. با بالا بودن میزان اسپرماتوکریت به دلیل بیشتر بودن میزان تعداد اسپرماتوزوآ در واحد حجم شانس انجام لقاح در این سن بالاتر بوده است که میزان اسپرماتوکریت این سن نیز اختلاف معنی‌داری را با دو سطح سنی دیگر نشان می‌دهد و در سطح بالاتری قرار دارد (نمودار ۳). به این دلیل میزان چشم زدگی نیز در این سن در گروه شاهد بالاتر از فعال کننده‌ها بوده و فعال کننده‌ها نتوانسته‌اند اثر اصلی خود را که افزایش مدت زمان تحرک اسپرم و به دنبال آن بالا بردن شانس انجام لقاح و افزایش میزان چشم زدگی در مقایسه با گروه شاهد را بخوبی به نمایش بگذارند. تغییرات کیفی اسپرم در طول فصل تکثیر بر روی مار ماهی خاردار (*Mastacembelus mastacembelus*) توسط Sahinoz و همکاران در سال ۲۰۰۷ بررسی شد. نتایج نشان داد که درصد سلول‌های متحرک اسپرم بعد از اولین اسپرم دهی در اول فصل تکثیر، بشکل معنی‌داری بهبود می‌یابد. همچنین طول دوره تحرک اسپرم به طور معنی‌داری از ابتدای فصل تکثیر به طرف اواخر دوره، افزایش می‌یابد. نتایج این تحقیق همچنین مشخص نمود که غلظت اسپرم در طول فصل تکثیر بطور معنی‌داری تغییر می‌یابد.

نمودار ۳ نشان می‌دهد که میزان اسپرماتوکریت در مولدین نر $۲^+$ ساله بالاترین و در مولدین نر $۳^+$ ساله کمترین میزان و مولدین نر $۴^+$ ساله حد واسط این دو مقدار قرار دارند و این سن با دو سطح سنی دیگر اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. Tekin و همکاران در سال ۲۰۰۳ نتایج مشابهی را در مورد غلظت اسپرم ماهیان نر قزل آلا گزارش کردند که نتایج این تحقیق نیز تایید کننده این مطلب می‌باشد. در سال ۲۰۰۲، Liley و همکاران گزارش نمودند که غلظت

اسپرم در ماهیان نر قزل‌آلایی که برای اولین بار اسپرم دهی می‌کنند در مقایسه با ماهیان نر ۳ ساله بالاتر می‌باشد. در سال ۲۰۰۱، Hoysak and Liley گزارش دادند که اسپرماتوکریت نرهای ۳ ساله در مقایسه با نرهای ۵ ساله در ماهی Sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) بالاتر می‌باشد. نتایج این تحقیق‌ها کاهش میزان اسپرماتوکریت را از سن‌های پایین به طرف سن‌های بالاتر نشان می‌دهد. نتایج تحقیق حاضر نیز با یافته‌های تحقیق‌های مذکور مشابهت دارد و نتایج آنها را تایید می‌نماید. نتایج این تحقیق و روند تغییرات اسپرماتوکریت در سن‌های متفاوت نر دقیقا نتایج روند تغییرات غلظت اسپرم در تحقیق Tekin و همکاران در سال ۲۰۰۳ را تایید می‌نماید. نتایج میزان اسپرماتوکریت انفرادی مولدین نر در سن‌های متفاوت (نمودار ۳) نشان می‌دهد که از سن‌های پایین به طرف سن‌های بالا، غلظت اسپرم یک روند کاهشی را طی می‌کند. شاید این امر به دلیل افزایش تولید حجم اسپرم در سن‌های بالا باشد زیرا هر چه اندازه مولد بزرگتر باشد، اندازه بیضه‌ها نیز بزرگتر می‌شود و به نسبت آن حجم اسپرم بالاتر می‌رود و از آنجا که رابطه حجم اسپرم و غلظت آن به صورت یک رابطه معکوس می‌باشد(۱۹) پس با افزایش سن حجم اسپرم بیشتر شده، اما غلظت آن کاهش می‌یابد. نتایج این تحقیق در مورد کاهش غلظت اسپرم از سن‌های پایین به طرف سن‌های بالاتر یافته‌های Tekin و همکاران در سال ۲۰۰۳، یافته‌های Liley و همکاران در سال ۲۰۰۲ در ماهی قزل‌آلا و نتایج Hoysak and Liley در سال ۲۰۰۱ در ماهی (*Oncorhynchus nerka*) را تایید می‌نماید.

به عنوان جمع بندی نهایی می‌توان عنوان کرد که در کارگاه‌های تکثیر، مولدینی که غلظت اسپرم بالا دارند نیاز به استفاده از فعال کننده نمکی جهت تداوم حرکت اسپرم نخواهند داشت زیرا افزایش تعداد اسپرماتوزوآ در واحد حجم می‌تواند اثرات کاهش تحرک را در لقاح جبران نماید. اما در صورت استفاده از مولدین نر دارای سنین بالا که اسپرم آنها رقیق‌تر می‌باشد، از فعال کننده‌های نمکی جهت افزایش شانس رسیدن اسپرم به تخمک و انجام لقاح استفاده گردد.

## References

1. Aas, G.H., Refstie, T., Gjerde, B. (1991) Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. Aquaculture. 95: 125-132.
2. Ahmadian, N., Mojazi-Amiri, B., Abtahi, B., Nazari, R. M. (2002) Use of sperm activating solutions in propagation of Iranian sturgeon (*Acipenser persicus*). In second national-regional symposium on sturgeon fishes. pp.111-115.
3. Alavi, S. M. H., Mojazi-Amiri, B., Cosson, J., Pourkazemi, M., Karami, M. (2002) Primary investigation in sperm motility of Iranian sturgeon - a comparative study in fresh-water and different saline solutions. In second national-regional symposium on sturgeon fishes. pp.128-130.
4. 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.
5. Billard, R. (1986) Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. Reprod. Nutr. Develop. 26: 877-920.
6. Billard, R., 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.
7. Billard, R. (1990) Culture of salmonids in fresh water. Aquaculture, 2: 549-592.
8. Billard, R. (1992) Reproduction in rainbow trout: Sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. Aquaculture. 100: 263-298.
9. Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., Linhart. O. (1995) Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture. 124: 95-112.
10. 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.
11. Hoysak, D. J., Liley, N. R. (2001) Fertilization dynamics in sockeye salmon and a comparison of sperm from alternative male phenotypes. J. Fish Biol. 58:1286-1300.

12. Liley, N. R., Tamkee, P., Tsai, R., Hoysak, D.J. (2002) Fertilization dynamics in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of male age, social experience, and sperm concentration and motility on ivitro fertilization. Can.J. Fish. Aquat. Sci. 59: 144-152.
13. Moccia, R.D., Munkittrick, K.R. (1986) Relationship between the fertilization of rainbow trout (*Salmo gairdeneri*) eggs and the motility of spermatozoa. Theriogenol. 27: 679-688.
14. Parafkandeh, H. F. (2000) Methods to identify the age of aquatic organisms. Publication of Iranian Fisheries Research Organization. pp.13-15.
15. Rakitin, A., Ferguson, M., Trippel, E. (1999) Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic Cod (*Gadus morhua*): Correlation and variation during the spawning season. Aquaculture. 170: 349-358.
16. Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F., Nash, J. P. (2004) The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture. 234: 1-28.
17. Sahinoz, E., Aral, F., Dogu, Z. (2007) Changes in Mesopotamian spiny eel, Mastacembelus mastacembelus (Bank & Solender in Russell, 1794) (*Mastacembelidae*) milt quality during a spawning period. Theriogenol. 67: 848-854.
18. 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.
19. Tekin, N., Secer, S., Akcay, E., Bozkurt, Y., 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., Bronnikov, G.E. (2002) Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories. Biol. Reprod. 66: 98-105.
22. Yagane, S. (2002) Effect of activating solution on sperm motility of *Mugil cephalus*, Faculty of Natural Resourses, Univ. Tehran. Msc. Thesis. pp.112.

*J.Vet.Res. 63,5: 345-350,2008*

# INTERACTION OF MALE BROODSTOCK AGE AND DIFFERENT DILUTION ON EYED EGGS RATE IN RAINBOW TROUT *(ONCORHYNCHUS MYKISS)*

**Lorestany, R.[1], Ahmadi, M.R.[2]*, Kalbassi, M. R.[3]**

[1]*Graduaied from the, Faculty of Natural Resourses Tarbiat Modares University, Noor- Iran.*

[2]*Department of Health and Aquatic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran/Iran.*

[3]*Department of Fisheries, Faculty of Natural Resourses, Tarbiat Modares University, Noor- Iran.*

(Received 12 December 2006 , Accepted 1 May 2007)

***Abstract:***

Interaction effect of three level of male age broodstock and three type of diluents (distilled water and diluents 1 and 2) for duration of motility and eyed egg rate in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) have been studied. There was no significant difference in activation of sperm by control group (distilled water) in different male ages (p?0.05). Diluents 1, in 3+ year male broodstock has shown, the highest motility (98/4 s) which was significant, comparison to the other male ages. In diluents 2, 3+ year male show highest duration of motility (96/2 sec) in comparison of 2+ and +4 year male broodstock also have showed the highest motility, in comparison to 2+ and 4+ year male whereas, the 2+ year male has the lowest sperm motility. By control group, 2+ year male have shown the highest eyed egg rate (86/8 %) if compared to other male ages. Diluents 1, with 2+ year male age, showed the highest eyed egg rate which was significant, compare to other age groups. Activation of sperm by diluents 2, showed the highest eyed egg rate in 2+ and 3+ year male age broodstock.

**Key words:** Age, Diluents, Eyed egg, *Oncorhynchus mykiss*.

***Corresponding author's email: mahmadi@ut.ac.ir, Tel: 021-61117092, Fax: 021-66933222**