



بیست و یکمین کنفرانس هشتای ایران

۶ و ۷ اسفند ماه ۱۳۹۳ دانشگاه اصفهان

تأثیر پرتو گاما بر کیفیت اسپرم، درصد لقاح، چشم زدگی و تفریح تخم ماهیان تمام ماده آزاد

دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

غلامرضا شاه حسینی^{۱*}، علیرضا نیسی^۱، مهدی سلطانی^۲، جمشید امیری مقدم^۱، حامد مجیدی زاهد^۱، رضا فرجی^۱

(۱- سازمان انرژی اتمی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)

(۲- دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان)

چکیده:

اسپرم استحصال شده از ماهی آزاد دریای خزر توسط کبالت ۶۰ با دزهای ۴۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰، ۹۰۰ و ۱۰۵۰ اگری مورد پرتو دهی شد. پس از آن درصد تحرک اسپرم با میکروسکوپ نوری در تیمارهای مختلف اندازه گیری و برای القای ماده زایی از شوک دمایی (۲۸ درجه سانتی گراد) استفاده شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اسپرم پرتو دهی شده با دز ۹۰۰ اگری دارای بیشترین میزان تحرک بود ($p > 0/05$). همچنین بیشترین درصد لقاح، چشم زدگی و تفریح تخم در تیمار ۹۰۰ و ۱۰۵۰ اگری بود ($p > 0/05$). نتایج حاصل از این تحقیق نشان میدهد که دز ۹۰۰ اگری بهترین دز برای انجام ماده زایی می باشد و می توان در مطالعات بعدی از این نتایج برای القای ماده زایی استفاده کرد.

کلید واژه: ماهی آزاد دریای خزر، پرتو گاما، ماده زایی، کیفیت اسپرم، درصد لقاح

مقدمه

خانواده آزاد ماهیان (Salmoniforms) به صورت طبیعی و پرورشی به صورت گسترده ای در سراسر دنیا پراکنده شده اند. ماهی آزاد دریای خزر یکی از ۹ زیر گونه قزل آلابی قهوه ای (*Salmo trutta*) می باشد [۱] این ماهی از گونه های بومی و مهاجر دریای خزر می باشد [۱] و دارای ارزش اقتصادی بالایی است [۲، ۳]. با توجه به بازارپسندی و قیمت بالایش به عنوان گونه ای مناسب در صنعت شیلات کشور مطرح می باشد [۴]. با افزایش تقاضا برای تولید غذا از طریق آبی پروری، پرورش ماهیان سردآبی از جمله ماهی آزاد از اهمیت خاصی برخوردار بوده و طبق آمار، تولید و پرورش این ماهیان در جهان به بیش از ۴۷۳/۵۵۰ هزار تن در سال رسیده است [۵]. مشکلات این صنعت مهم نظیر بالا بودن هزینه های مربوط به پرورش، بالا بودن ضریب تبدیل غذایی، کندی رشد و... در دوره پرورش است. در این راستا امروزه دستکاری کروموزومی گونه های مختلف آبزیان به عنوان یک روش مفید در بهبود ویژگی های ژنتیکی ماهیان بسیار رایج می باشد [۶]. در ماهی آزاد دریای خزر پدیده بلوغ جنسی در جنس نر خیلی زودتر از جنس ماده به وقوع می پیوندد [۷، ۸]. ماده زایی در ماهی آزاد دریای خزر با توجه به رسیدگی زود هنگام جنس نر



بیست و یکمین کنفرانس هشتای ایران

۶ و ۷ اسفند ماه ۱۳۹۳ دانشگاه اصفهان

و رشد بیشتر در جنس ماده می تواند از اهمیت زیادی برخوردار باشد. گونه ماهی آزاد دریای خزر از گونه های پر طرفدار و کند رشد می باشد که با استفاده از ماده زایی می توان تولید گوشت بیشتر را در یک پرورش این گونه ترغیب کرد که این برای پرورش دهنده از اهمیت زیادی برخوردار است. پدیده بلوغ جنسی در بسیاری از ماهیان از جمله ماهی آزاد دریای خزر باعث کاهش رشد بدن می شود [۹]. زیرا انرژی که باید صرف تولید گوشت شود، صرف توسعه اندام های تولید مثلی و بروز صفات ثانویه جنسی و رفتارهای تولید مثلی می شود. لذا استفاده از جمعیت های تمام ماده که به طرق مختلف، باعث افزایش بازده تولید می گردد [۱۰]. یکی از راه های القای جمعیت تمام ماده (Gynogenesis) در آزاد ماهیان عقیم سازی اسپرم با استفاده از پرتو گاما ساعت شده از کبالت ۶۰ می باشد [۱۱]. کیفیت اسپرم و درصد باروری از مهمترین شاخص های تکثیر ماهی می باشند [۷، ۸]. با توجه به اینکه پرتو دهی با استفاده از پرتو گاما می تواند سبب کاهش بازده القای ماده زایی شود [۷، ۸]، استفاده از مطالعات میکروسکوپی برای مطالعه کیفیت اسپرم می تواند در پیدا کردن بهترین دز القای ماده زایی با این روش ما را یاری نماید. در این بررسی از انرژی حاصل از پرتوهای گاما (ساعت شده از کبالت ۶۰) جهت ماده زایی ماهی آزاد دریای خزر استفاده خواهد شد. هدف اصلی از این پژوهش تعیین کیفیت اسپرم و بررسی درصد لقاح، چشم زدگی و تفریح ماهیان آزاد القا شده به وسیله کبالت ۶۰ در دزهای مختلف بود.

مواد و روشها

به منظور ماده زایی و انجام آزمایشات مربوط به آن از ۵ عدد ماهی مولد ماده و ۵ عدد ماهی مولد نر آماده تکثیر مزرعه تکثیر و پرورش ماهی آزاد دریای خزر استحصال اسپرم و تخمک صورت گرفت. مقدار لازم اسپرم و تخمک با استفاده از فشار اندک به ناحیه شکمی ماهی مولد نر و ماده از سمت سر (باله سینه ای) به ساقه دم استحصال شد. تخمک (درون مایع سلومیک) و اسپرم استحصال شده در مجاورت یخ دور از دسترس آب (دمای کنترل شده ۴-۵ درجه سانتیگراد) به پژوهشکده کشاورزی هسته ای منتقل گردید. برای حصول اطمینان از کیفیت اسپرم استحصال شده ماهی آزاد دریای خزر، (مدت زمان تحرک و نوع حرکت اسپرم) از میکروسکوپ نوری استفاده شد. رقیق سازی اسپرم با کیفیت مناسب با محلول رقیق کننده صورت گرفت [۱۱]، و آن درون بشر ریخته شده و جهت غیر فعال سازی محتوی ژنتیکی با دزهای ۴۵۰ و ۶۰۰ و ۷۵۰ و ۹۰۰ و ۱۰۵۰ گری حاصل از پرتو گاما ساعت شده از کبالت ۶۰، با استفاده از گاماسل به صورت جداگانه پرتو دهی شدند. میزان تحرک و کیفیت اسپرم در تیمارهای مختلف قبل از لقاح نیز مورد اندازه گیری قرار گرفت. در مرحله بعد لقاح به صورت خشک با مخلوط نمودن تخمک و اسپرم پرتو دیده (۱-۰/۵ سی سی اسپرم برای هر ۱۰۰۰ قطعه تخمک) با استفاده از سرم فیزیولوژیکی انجام شد (شکل ۱). جهت القای پلویدی در تخمها، حمام آبی با درجه حرارت های ۲۶-۲۸ درجه سانتی گراد برقرار گردیده و تخم های لقاح یافته در زمان ۴۰ دقیقه پس از لقاح به مدت ۱۰ دقیقه تحت شوک



بیست و یکمین کنفرانس هسته‌ای ایران

۶ و ۷ اسفند ماه ۱۳۹۳ دانشگاه اصفهان

حرارتی قرار گرفتند [۱۲]. پس از اعمال شوک تخمهای لقاح یافته به سیستم انکوباسیون مدار بسته تخم ماهی با دمای 10°C منتقل گردیده و جهت ادامه تکامل مراحل جنینی درون این انکوباتورها نگهداری شدند. یک گروه شاهد بمنظور بررسی شرایط اپتیمال لقاح اسپرم و تخمک در نظر گرفته شده که در این گروه لقاح با تخمک و اسپرم نرمال، بدون استفاده از شوک حرارتی بود. بمنظور بررسی شرایط اپتیمال شوکهای حرارتی یک گروه شاهد هاپلوئید که حاصل لقاح اسپرم پرتوخورده و تخمک نرمال ولی بدون شوک حرارتی (هاپلوئید) در نظر گرفته شد.

طرح آزمایش

هر واحد آزمایشی از یک قفسه از انکوباتور مدار بسته تشکیل شده بود. مخزن نگهداری آب در این انکوباتور توسط یک هواده مرکزی به صورت شبانه روزی هوا دهی و دمای آن نیز به صورت شبانه روزی کنترل و در دمای 10°C سانتی گراد به صورت اتوماتیک ثابت نگذاشته می‌شد. جریان آب در کلیه واحدهای آزمایشی به صورت شبانه روزی برقرار بود.

نمونه برداری از تخم ماهیان و اندازه‌گیری درصد چشم زدگی

۲۴ ساعت بعد از عملیات لقاح درصد لقاح در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری شد. همچنین ۱۹ روز بعد از لقاح درصد چشم زدگی تخم ماهیان آزاد تیمارهای مختلف اندازه‌گیری شد، همچنین ۴۰ روز پس از لقاح میزان تفریخ در تیمارهای مختلف آزمایشی محاسبه شد:

$100 \times (\text{تعداد کل تخم های نمونه برداری شده} / \text{تعداد تخم ماهیان. تقسیم شده}) = \text{درصد لقاح}$

$100 \times (\text{تعداد کل تخم های نمونه برداری شده} / \text{تعداد تخم ماهیان. چشم زده شده}) = \text{درصد چشم زدگی}$

زدگی

$100 \times (\text{تعداد کل لاروهای نمونه برداری شده} / \text{تعداد لارو ماهیان. تفریخ شده}) = \text{درصد تفریخ}$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنوف بررسی شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از تجزیه واریانس یک طرفه انجام و سطح معنی‌دار بودن در بین تیمارها از طریق آزمون (Tukey) در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید. تجزیه و تحلیل آماری به وسیله نرم‌افزار SPSS 17 در محیط ویندوز انجام شد.

نتایج و بحث



بیست و یکمین کنفرانس هشتای ایران

۱۷ و ۱۸ اسفند ماه ۱۳۹۳ دانشگاه اصفهان

درصد تحرک اسپرم بعد از پرتودهی

نتایج حاصله از بررسی اسپرم با میکروسکوپ نوری نشان داد که پرتودهی سبب کاهش تحرک اسپرم در تیمارهای مختلف شده است (جدول ۱). نتایج نشان می دهد که اسپرمی که برای گروه شاهد در نظر گرفته شده بود دارای بیشترین زمان تحرک (۵۸ ثانیه) بود. همچنین نتایج نشان می دهد در بین تیمارهای پرتودهی شده اسپرم پرتودهی شده با دز ۹۰۰ دارای بیشترین زمان تحرک (۳۷ ثانیه) جهت ماده زایی می باشد (جدول ۱).

جدول شماره ۱

کیفیت اسپرم در تیمارهای مختلف

تیمار	میزان تحرک قبل از پرتودهی (ثانیه)	میزان تحرک بعد از پرتودهی (ثانیه)
شاهد	۵۸±۱	۵۶±۰/۵ ^a
۴۵۰	۵۸±۱	۲۴±۱/۵ ^d
۶۰۰	۵۸±۱	۲۷±۰/۵ ^d
۷۵۰	۵۸±۱	۲۱±۱/۵ ^c
۹۰۰	۵۸±۱	۳۷±۱/۵ ^b
۱۰۵۰	۵۸±۱	۲۶±۱/۵ ^d

مقایسه میانگین درصد تحرک اسپرم ماهی آزاد، دریای خزر با دوزهای مختلف

اعداد (SD ± میانگین) در یک ردیف با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار هستند ($P < 0/05$)

درصد لقاح، چشم زدگی و تفریح لارو ماهی آزاد دریای خزر

نتایج حاصل از این آزمایش نشان میدهد که اختلاف معنی داری بین میزان لقاح، چشم زدگی و تفریح ماهیان مربوط به گروه های مختلف آزمایشی وجود دارد ($p > 0/05$) (جدول ۲). بیشترین میزان لقاح، چشم زدگی و تفریح لارو ماهی آزاد در گروه شاهد ملاحظه شد ($p > 0/05$) (جدول ۲)، و در بین تیمارهای ماده زایی شده بیشترین درصد لقاح، چشم زدگی و تفریح لارو ماهی آزاد مربوط به تیمار ۹۰۰ گری بود. نتایج نشان داد که در تیمار هاپلوئید در مراحل ابتدایی تقسیم سلولی و لقاح تخم صورت نگرفته و در مرحله لقاح از تیمارهای آزمایشی حذف گردید. علت حذف این تیمار می تواند ناشی از حذف ژنوم اسپرم ماهی آزاد در اثر پرتودهی باشد. [۱۳]. که این نشان دهنده موفقیت در پرتودهی می باشد همچنین موفقیت لقاح در سایر تیمارهای موفقیت ماده زایی در تیمارهای دیگر را نشان می دهد.



بیست و یکمین کنفرانس هسته‌ای ایران

۶ و ۷ اسفند ماه ۱۳۹۳ دانشگاه اصفهان

جدول ۲: مقایسه میانگین درصد لقاح، چشم زدگی در ماهی آزاد تحت تیمارهای آزمایشی

شاهد	۴۵۰	۶۰۰	۷۵۰	۹۰۰	۱۰۵۰	
% لقاح	۸۱±۳/۵ ^d	۴۶±۲/۲۱ ^a	±۳/۱۱ ^a	۴۳±۲/۱۷ ^a	۶۴±۲/۰۱۲ ^c	۵۴±۱/۱۲ ^b
۴۱						
% چشم زدگی	۷۵±۱/۲ ^d	۳۶±۲/۴۱ ^a	±۳/۱۱ ^a	۳۳±۲/۱۷ ^a	۵۶±۱/۳۲ ^c	۴۴±۳/۰۲ ^b
۲۹						
% تفریخ	۶۵±۲/۳ ^d	۱۹±۱/۶ ^a	±۱/۲۱ ^a	۲۲±۱/۳۷ ^a	۴۲±۱/۴۲ ^c	۴۱±۱/۹ ^b
۱۶						

مقایسه میانگین درصد لقاح، درصد چشم زدگی و درصد تفریخ ماهی آزاد، با دزهای مختلف اعداد (SD ± میانگین) در یک ردیف با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار هستند ($P < 0/05$)

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که، با استفاده از دزهای مختلف حاصل از پرتو گاما می‌توان سبب القای ماده زایی شد [۱۰]، و در این بین دز ۹۰۰ بهترین دز پرتو دمی اسپرم به این منظور می‌باشد. و از این دز می‌توان به منظور بررسی‌های بیشتر ماهیان ماده زایی شده استفاده کرد.

References:

۱. Quillet, E., et al., *The potential of brown trout (Salmo trutta L.) for mariculture in temperate waters*. Agric Sci, 1992. **6**: p. 63-76
۲. Yousefian, M., *Stock Identification and Genetic Variation at Microsatellite Loci of Caspian Sea Salmon (Salmo trutta caspius)*. World Journal of Fish and Marine Sciences, 2010. **2**(6): p. 508-512
۳. Kiabi, B.H., A. Abdoli, and M. Naderi, *Status of fish fauna in the south Caspian basin of Iran*. Zoology in the Middle East, 1999. **18**: p. 57-65
۴. Moghaddam, J.A., A. Abedian-Kenari, and S.K. b, 2013. **412-413**: p. 144-150
۵. Vannuccini S. FAO, F.I., Data and Statistics Unit Food and and .A.O.o.t.U.N.A.a.f.f.f.s. overviewpdf



بیست و یکمین کنفرانس هسته‌ای ایران

۷ و ۶ اسفند ماه ۱۳۹۳ دانشگاه اصفهان

۶. Omoto, N., et al., *Sex ratio of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid the bester (Huso huso female X Acipenser ruthenus male)*. Aquaculture *sturgeon* 2005. **245**: p. 39-47
۷. Bye, V.J. and R.F. Lincoln, *Commercial methods for the control of, sexual maturation in rainbow trout (Salmo gairdneri R.)*. Aquaculture, 1986. **57**: p. 299-309
۸. Pandian, T.J. and S.G. Sheela, *Hormonal induction of sex reversal in fish*. Aquaculture, 1995. **138**: p. 1-22
۹. Johnstone, R., et al., *Sex reversal rainbow trout*. Aquaculture, 1979. **18**: p. 13-19
۱۰. Sheehan, R.J., et al., *Better growth in all-female diploid and triploid rainbow trout*. Trans. Am. Fish. Soc, 1999. **128**: p. 491-498
۱۱. Kato, K., et al., *Viability, growth and external morphology of meiotic- and mitotic gynogenetic diploids red sea bream, Pagrus major*. Journal of Applied Ichthyology, 2001. **1**: p. 97-103
۱۲. Kalbassi, M.R., et al., *Triploidy induction in the Caspian salmon, Salmo trutta caspius, by heat shock*. J. Appl. Ichthyol, 2009. **25**: p. 104-107
۱۳. Komen, J., et al., *Gynogenesis in common carp (Cyprinus carpio) in Growth, phenotypic variation and gonad differentiation in normal and methyltesteronetreated homozygous clones and F1 hybrids*. Aquaculture, 1993. **111**: p. 271-280