تأثیر اسپرم‌گیری مجدد بر روی برخی پارامترهای اسپرم‌شناختی، درصد لقاح و روند انکوباسیون در ماهی آزاد وحشی (*Salmo trutta caspius*, Kessler 1877)

چکیده

تحقیق حاضر در سال ۱۳۸۸ در مرکز بازسازی ذخائر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت صورت گرفت. جهت انجام آن، از ۳۰ قطعه مولد نر وحشی استفاده شد. در مرحله اول از همه مولدین نر (۳۰ مولد) بصورت جداگانه اسپرم‌گیری صورت گرفت. عمل لقاح با مخلوط اسپرم‌ها و تخمک‌های استحصال شده از ۱۳ قطعه مولد ماده انجام شد و پس از آبگیری تخم‌ها، به سالن انکوباسیون انتقال یافتند تا روند انکوباسیون در آن‌ها بررسی گردد. ۸ روز بعد دومین مرحله اسپرم‌گیری و ۱۷ روز بعد از مرحله دوم، سومین مرحله اسپرم‌گیری نیز همانند مرحله اول اجرا شد و برای مرحله دوم از ۲۵ قطعه مولد نر و ۱۰ قطعه مولد ماده و مرحله سوم ۱۵ قطعه مولد نر و ۷ قطعه مولد استفاده گردید. در پایان هر ۳ مرحله تراکم اسپرم، درصد اسپرماتوکریت، حجم اسپرم، میزان تحرک و مرفولوژی اسپرماتوزوئید (درصد اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی) ثبت شد و اثر آن بر روی درصد لقاح، چشم‌زدگی، تخم‌گشایی و در پایان بازماندگی لاروهای حاصل در طی اسپرم‌گیری های مکرر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حجم، تحرک، مرفولوژی اسپرم در ۳ مرحله از تحقیق اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($P<۰/۰۵$). بیشترین درصد لقاح (۹۶/۲۹ درصد)، درصد چشم‌زدگی (۹۱/۵۲ درصد) و درصد تخم‌گشایی (۹۳/۸۲ درصد) در مرحله اول و کمترین آن‌ها در مرحله سوم مشاهده گردید. در فاکتورهای تراکم اسپرم، اسپرماتوکریت، و درصد بازماندگی لارو تا مرحله جذب کیسه زرده در ۳ مرحله اختلاف معنی‌دار آماری بدست نیامد ($P>۰/۰۵$).

واژگان کلیدی: ماهی آزاد دریای خزر، اسپرم‌گیری مجدد، تکثیر مصنوعی، درصد لقاح.

حسین خارا[1*]
سمیه شمس‌پور[2]
مصطفی رضوانی[3]
محدثه احمدنژاد[4]
مینا رهبر[5]
سید سمانه موسوی[5]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، لاهیجان، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد شیلات، لاهیجان، ایران
۳. مرکز بازسازی ذخایر آزاد ماهیان شهید باهنر، کلاردشت، ایران
۴. پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی، بخش آبزی‌پروری، بندر انزلی، ایران
۵. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، باشگاه پژوشگران جوان، لاهیجان، ایران

[*]مسئول مکاتبات:
h.khara1974@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۱۰

مقدمه

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) از ماهیان با ارزش دریای خزر است که منحصراً در دریای خزر و بویژه سواحل جنوبی آن یعنی حاشیه ساحلی ایران زندگی می‌کند و جهت تخم‌ریزی عمدتاً به رودخانه‌های کوچک سواحل جنوبی دریا (شفارود، گرگانرود، آستاراچای، تنکابن و تعدادی دیگر از رودخانه‌های ایران) مهاجرت می‌نماید (کازانچف، ۱۹۸۱).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-23]

بر اساس آمار موجود میزان صید ماهی آزاد دریای خزر در سال‌های ۲۷-۱۳۲۶ حدود ۱۷ تن بوده است و سپس در سال‌های بعد به تدریج از میزان آن کاسته است (پاشازانوسی، ۱۳۸۳). به دلایل متعدد از جمله افزایش میزان صیادی، پیشرفت در وسایل صید، صید بی‌رویه، آلودگی دریای خزر و رودخانه‌های مسیر مهاجرت، ایجاد موانع در مسیر مهاجرت، پایین بودن میزان هم‌آوری و ... از عوامل مهم در کاهش نسل این ماهی ارزشمند می‌باشد (جمالزاده، ۱۳۸۰). راهکارهای متعددی در جهت رفع این مشکل و در نتیجه حفظ و بازسازی ذخایر این ماهی پیشنهاد می‌شود. اما در این میان امر تکثیر و پرورش مصنوعی ماهیان آزاد دریای خزر و سپس رهاسازی بچه‌ماهیان آن در منابع آبی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به همین دلیل از سال ۱۳۶۲ در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی شهید باهنر کلاردشت به منظور بازسازی ذخایر، تکثیر و پرورش مصنوعی آن انجام می‌شود (پاشازانوسی، ۱۳۸۳).

در این راستا، بررسی اثر توان باروری مولدین نر و ماده و کاربرد گامت‌هایی با کیفیت بالا از مولدین اهمیت زیادی در اطمینان از تولید لاروهای بهتر دارد (Kjorsvik *et al*., 1990). ارزیابی کیفیت اسپرم جهت افزایش کارایی تکثیر مصنوعی حائز اهمیت می‌باشد ولی معمولا" در صنعت آبزی پروری بیشتر به کیفیت تخمک توجه می‌گردد و در مورد کیفیت اسپرم توجه جدی صورت نمی‌گیرد. این در حالیست که کیفیت هردو نوع گامت روی موفقیت لقاح و بقای لارو مؤثر است (Rurangwa *et al*., 2004).

دسترسی به اسپرم با کیفیت مناسب یکی از عوامل مهم و ضروری در جهت افزایش کارایی تکثیر مصنوعی ماهیان است (Hajirezaee *et al*., 2009). کیفیت اسپرم یک عامل تعیین کننده در توانایی لقاح می‌باشد که می‌تواند تحت تأثیر عوامل متعدد خارجی و یا نحوه مدیریت مولدین قرار گیرد (Bobe and Labbé, 2009). تحرک اسپرماتوزوا، میزان اسپرم و تراکم اسپرماتوزوا شاخص‌های خوبی برای کیفیت اسپرم هستند (Cabrita *et al*., 2001; Tekin *et al*., 2003). غلظت اسپرم درصد لقاح را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Obraztsov, 1985) و حجم اسپرم یکی از ویژگی های اثرگذار بر میزان اسپرم و تراکم اسپرماتوزوا است (Moon *et al*., 2003). کارایی مولدین نر می‌تواند به زمان و شرایط رها سازی اسپرم، توانایی اسپرم یک ماهی نر نسبت به نرهای دیگر و به تعداد اسپرم‌های رها سازی شده وابسته باشد (Gage *et al*., 1995).

طی فعالیت‌های تکثیر مصنوعی از ماهیان نر بالغ، در صورت نیاز بیش از یکبار اسپرم‌گیری می‌شود که این امر به دلیل کمبود تعداد مولدین نر و یا بلوغ دیر رس آن‌ها می‌باشد (Dettlaff *et al*., 1993; Piros *et al*., 2002). براساس مطالعات گذشته بین اسپرم استحصالی از نرهای مختلف یا حتی در مورد یک مولد خاص طی دفعات مختلف اسپرم‌گیری، تفاوت‌های زیادی می‌تواند وجود داشته باشد (Rana, 1995). از آنجا که در فرایند تکثیر مصنوعی ماهی آزاد دریای خزر، ممکن است با صید یک مولد ماده دسترسی به مولد نر مناسب امکان پذیر نباشد، برحسب نیاز از یک مولد برای بار دوم اسپرم‌گیری می‌شود. استرس ناشی از تکرار اسپرم‌گیری می‌تواند مشکلاتی را در تولید اسپرم یا کیفیت آن ایجاد نماید (Bobe and Labbé, 2009) بطوریکه اثر تخریبی انواع استرس بر تراکم، مدت زمان و درصد اسپرم‌های متحرک در سایر ماهیان از جمله باس سفید (Rurangwa *et al*., 2004) و گروهی از آزاد ماهیان نیز به اثبات رسیده است (Wagner *et al*., 2002).

ارزیابی مناسب کیفیت اسپرم جزء عوامل کلیدی در روند تولید موفق ماهی محسوب می‌گردد (Alavi *et al*., 2006). مطالعات کمی در مورد بررسی پارامترهای اسپرم در فواصل مکرر اسپرم‌گیری صورت گرفته است (Buyukhatipoglu and Holtz,1984; Gjerde, 1984; Piironen, 1985; Sanchez-Rodriguez *et al*., 1978; Suquet *et al*., 1992; Alavi *et al*., 2006; Dzyuba *et al*., 2012; Shaliutina *et al*., 2012) از این رو در مطالعه حاضر، تغییرات عوامل کیفی اسپرم ماهی آزاد دریای خزر همچون تراکم اسپرم، درصد اسپرماتوکریت (Rurangwa *et al*., 2004)، حجم اسپرم، میزان تحرک و مرفولوژی اسپرماتوزوئید (درصد اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی) و اثر آن بر روی درصد لقاح، چشم‌زدگی، تخم‌گشایی و در پایان بازماندگی لاروهای حاصل در طی اسپرم‌گیری‌های مکرر مورد بررسی قرار گرفت.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-23]

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال ۱۳۸۸ در مرکز بازسازی ذخائر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت صورت گرفت. در مرحله اول ۳۰ قطعه مولد نر و ۱۳ قطعه مولد ماده وحشی ماهی آزاد دریای خزر پس از صید و بیهوشی با MS۲۲۲ (به میزان ۱ گرم در ۱۰ لیتر)، زیست‌سنجی شده و طول کل (سانتی‌متر) همراه با وزن مولدین (گرم) هر کدام بصورت جداگانه ثبت شد (جداول ۱ و ۲).

جدول ۱: زیست‌سنجی مولدین نر ماهی آزاد وحشی (*Salmo trutta caspius*) مورد استفاده در تحقیق

مولد نر / مراحل اسپرم‌گیری	طول کل (سانتی‌متر)	وزن (گرم)
اول	۴۶/۹±۱۲/۲۲	۱۴۷۶/۶۶±۹۷۵/۰۹
دوم	۴۷/۳۲±۱۲/۸۸	۱۵۰۴±۱۰۴۴/۲۲
سوم	۴۹/۱۳±۱۳/۱۵	۱۷۱۳/۳۳±۱۱۶۸/۵۵

جدول ۲: زیست‌سنجی مولدین ماده ماهی آزاد وحشی (*Salmo trutta caspius*) مورد استفاده در تحقیق

مولد ماده / مراحل نمونه‌گیری	طول کل (سانتی‌متر)	وزن (گرم)	وزن تخم استحصالی (گرم)	تعداد تخم در یک گرم
اول	۴۶/۵۳±۲/۷۹	۱۲۸۰/۷۷±۳۱۴/۶۰	۱۲۸±۲۷/۴۷	۱۲±۱/۹۱
دوم	۴۶/۵۱±۲/۴۷	۱۲۲۵±۲۰۴/۴۶	۱۲۸/۸±۱۹/۹۰	۱۲/۳±۱/۳۳
سوم	۴۷/۳۳±۳/۵۶	۱۲۴۲/۸۶±۲۰۹/۰۲	۱۳۷/۱۴±۲۶/۴۳	۱۱/۹۲±۰/۹۳

ابتدا استحصال تخمک از مولدین ماده با روش مالش شکم (Stripping) صورت گرفت و تخمک‌های هر مولد ماده پس از توزین به دلیل یکنواختی کیفیت آن‌ها در یک تشتک پلاستیکی با هم مخلوط و سپس به ۱۳ قسمت مساوی تقسیم شدند. در مرحله اول از همه مولدین نر (۳۰ مولد) بصورت جداگانه اسپرم‌گیری صورت گرفت و این مولدین جهت ثبت زیست‌سنجی و بررسی دقیق‌تر با علامت‌گذاری از هم جدا شده و در ۵ گروه ۶ تایی در حوضچه‌های جداگانه نگه‌داری شدند. میزان ۱/۵ میلی‌لیتر از اسپرم‌های استحصال شده از هر مولد نر بصورت جداگانه به منظور آزمایشات تعیین کیفیت اسپرم به آزمایشگاه انتقال داده شد. اسپرم استحصالی از هر ۳۰ مولد نر به دلیل ایجاد شرایط یکسان، با هم مخلوط شده و عمل لقاح با اضافه کردن اسپرم‌ها به تخمک‌های هر ۱۳ ظرف انجام شد. پس از آبگیری تخم‌ها و سفت شدن آن‌ها، به ۱۳ سینی در چهار تراف در سالن انکوباسیون انتقال یافتند تا روند انکوباسیون در آن‌ها بررسی گردد. از یک هفته بعد، این مولدین مرتباً مورد معاینه قرار گرفتند تا در صورت آمادگی، اسپرم‌گیری شوند. هشت روز بعد، پس از معاینه مولدین نر علامت‌گذاری شده، از ۲۵ مولد نر دوباره اسپرم‌گیری صورت گرفت. حدود ۱ سی‌سی (به دلیل کاهش حجم اسپرم در این مرحله) از اسپرم‌ها قبل لقاح برای مطالعه کیفیت آن در ظرف نمونه‌گیری (ویال پلاستیکی) ریخته شده و مجدداً به آزمایشگاه ارسال شد. همزمان ۱۰ قطعه مولد ماده (برای اولین بار) آماده تکثیر نیز به منظور فرآیند لقاح تخم‌کشی و پس از مخلوط کردن به ۱۰ قسمت مساوی تقسیم و در ۱۰ ظرف ریخته شد. مخلوط اسپرم‌های استحصالی مرحله دوم نیز با تخمک‌های استحصالی مخلوط شده و عمل لقاح صورت گرفت. پس از آبگیری تخم‌ها و سفت‌شدن آن‌ها، به ۱۰ سینی در سه تراف در سالن انکوباسیون انتقال یافتند تا روند انکوباسیون در آن‌ها بررسی گردد. هفده روز بعد از مرحله دوم، دوباره عملیات قبلی تکرار شد و نمونه‌های اسپرم در این مرحله نیز به آزمایشگاه منتقل گشت با این تفاوت که در این مرحله ۱۵ مولد نر (از ۳۰ مولد اولیه قادر به تولید اسپرم بودند) و ۷ مولد ماده (برای اولین بار) و ۷ سینی در دو تراف استفاده گردید.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-23]

پس از عمل هم‌دمایی در سالن انکوباسیون، تخم‌های لقاح یافته در هر مرحله بطور کاملاً تصادفی بر حسب شماره‌های معین شده به سینی‌های چشمه ریز منتقل گشتند. به دلیل اثرات زیانبار نور بر تخم‌ها، سینی‌ها تا زمان رسیدن لاروها به مرحله تغذیه فعال به صورت سرپوشیده نگه‌داری شدند. در محل ورودی آب نیز یک فیلتر قرار داده شد تا از ورود مواد ناخواسته و گل و لای جلوگیری شود.

دو روز بعد از لقاح تا بعد از مشاهده اولین تفریخ تخم‌ها، تخم‌ها بوسیله مالاشیت‌گرین جهت پیشگیری از قارچ زدگی ضد عفونی شدند. میزان مالاشیت گرین مورد استفاده برای هر تراف ۱ گرم در لیتر بود که تخم‌ها یک روز در میان به مدت ۴۵ الی ۶۰ دقیقه در معرض این ماده قرار می گرفتند (روش حمام طولانی، شرایط معمول کارگاه).

هفت روز پس از لقاح، به منظور تعیین درصد لقاح در تیمارها، در حدود ۸۰ تخم، پس از شفاف‌سازی بوسیله محلول شفاف کننده شامل فرمالدهید ۵ درصد + اسید استیک ۴ درصد (لرستانی، ۱۳۸۳) مشاهده شده و نمونه‌های دارای کمربند عصبی مورد شمارش قرار گرفتند. میزان لقاح تخمک‌ها مطابق رابطه ذیل محاسبه و ثبت گردید (Bromage and Cumaranataunga, 1988).

درصد لقاح =(تعداد تخم‌های لقاح یافته / تعداد کل تخم‌ها) ×۱۰۰

حدود ۱۴ روز پس از لقاح، با روش شوک‌دهی، (Aas *et al*., 1991)، تخم‌های چشم‌زده از تخم‌های تلف شده مشخص گردید. تخم‌ها از فاصله ۲۰ سانتی‌متری در سینی دیگری تخلیه شده که طی این عمل تخم‌های لقاح نیافته یا تلف شده، سفید گشتند. تخم‌های تلف شده با استفاده از پوآر جمع‌آوری شده و مورد شمارش قرار گرفتند. تخم‌های چشم زده به دقت شمارش و میزان بازماندگی تخم‌ها تا مرحله چشم‌زدگی از طریق رابطه ذیل محاسبه گردید.

درصد چشم‌زدگی = (تعداد تخم‌های لقاح یافته / تعداد تخم‌های چشم‌زده) ×۱۰۰

با تفریخ شدن تخم‌ها و ظهور لارو دارای کیسه زرده (۳۰ تا ۳۵ روز پس از لقاح)، تخم‌های تفریخ نشده با استفاده از پوآر جمع‌آوری شده و پس از شمارش آن‌ها درصد تفریخ از طریق رابطه ذیل بدست آمد (Billard and Gillet, 1981).

درصد تفریخ = (تعداد تخم‌های چشم زده / تعداد لارو) ×۱۰۰

پس از اینکه لاروها تقریبا دوسوم کیسه زرده خود را جذب کردند (۵۵ تا ۶۰ روز پس از لقاح)، با شمارش لاروهای تلف شده، میزان بازماندگی لارو تا مرحله جذب کیسه زرده محاسبه شد و لاروهای سالم برای تغذیه دستی درون تراف ریخته شدند (Billard and Gillet, 1981).

در پایان هر ۳ مرحله حجم اسپرم، تحرک، مورفولوژی اسپرماتوزوئید، میزان اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم اندازه‌گیری و ثبت شد. بطوریکه برای محاسبه حجم اسپرم، مقدار اسپرم بدست آمده از هر مولد نر در مرحله اسپرم‌گیری را در داخل لوله سر مخروطی مدرج ریخته و حجم آن برحسب سانتی‌متر مکعب محاسبه گردید (Vladi *et al*., 2002).

برای بررسی حرکت اسپرم به دلیل غلظت بالای اسپرم، آن را به نسبت ۱:۲۰ (یک حجم اسپرم و ۲۰ حجم محلول) رقیق نموده برای این منظور ابتدا ۴۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی را روی لام ریخته و سپس ۲ میلی‌لیتر اسپرم به آن اضافه شد. آنگاه با یک لامل آن‌ها را کاملاً با هم مخلوط کرده و پس از تهیه گسترش در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ × حرکت اسپرماتوزوئید بررسی گردید (Suquet *et al*., 1992).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-23]

برای بررسی مورفولوژی اسپرماتوزوئید، یک قطره اسپرم هموژنیزه را در انتهای لام قرار داده و از آن یک گسترش تهیه گردید (همانند تهیه گسترش‌های خون) سپس آنرا در داخل هود گذاشته تا اسپرماتوزوئیدها فیکس شوند. سپس بر روی آن الکل ریخته (متانول) تا خشک شود، آنگاه با فوشین (فوشین مورد استفاده در رنگ‌آمیزی گرم) رنگ‌آمیزی کرده و بعد از ۲-۱ دقیقه گسترش مربوطه را با آب شسته و پس از خشک شدن گسترش،۵۰۰ عدد اسپرماتوزوئید را از نظر شکل در زیر میکروسکوپ با عدسی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون مورد بررسی قرار داده و اشکال غیر متعارف یا غیرطبیعی آن را یادداشت و ثبت گردید (ایزدی، ۱۳۷۱).

به منظور محاسبه میزان اسپرماتوکریت از اسپرم مولدین هر گروه سنی قبل از مخلوط نمودن آن‌ها، نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌برداری بوسیله لوله میکروهماتوکریت انجام گرفت (Aas *et al*., 1991; Tvedt *et al*., 2001). سپس نمونه‌ها بوسیله دستگاه میکروسانتریفیوژ (Aas *et al*., 1991; Rakitin *et al*., 1999; Liley *et al*., 2002) به مدت ۵ دقیقه و با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شدند (Vladi *et al*., 2002) و بوسیله خط‌کش مخصوص سنجش درصد اسپرماتوکریت، میزان اسپرماتوکریت هر نمونه خوانده شد.

برای شمارش اسپرماتوزوئیدهای جمع‌آوری شده از مولدین ابتدا آن‌ها را رقیق نموده و سپس در لام مخصوص هموسیتومتر و میکروسکوپ عمل شمارش را انجام داده و تراکم اسپرماتوزوئید از طریق رابطه ذیل محاسبه گردید (Suquet *et al*., 1992).

تراکم اسپرماتوزوئید در یک سانتی‌متر مکعب بصورت خالص = $x \times ۵ \times ۱۰^{۷}$

که x برابر با مجموع اسپرم در ۵ خانه لام هموسیتومتر می‌باشد.

برای تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها از نرم افزار SPSS 17 استفاده گردید. با توجه به اینکه داده‌ها وابسته می‌باشند (فاکتورها درون موردی می‌باشند) بنابراین جهت بررسی وجود اختلاف معنی‌دار آماری هر یک ار فاکتورهای اندازه‌گیری شده بین سه مرحله نمونه‌برداری (فاصله زمانی) از آزمونRepeated measures در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردیده و سپس با آزمون بن فرونی (Bonferroni) گروه‌ها از یکدیگر تفکیک گردیدند.

نتایج

نتایج حاصل از کیفیت اسپرم مولدین نر در جدول ۳ آمده است. نتایج نشان داد که بیشترین تراکم اسپرم، اسپرماتوکریت، حجم اسپرم و تحرک اسپرماتوزوئید در مرحله اول اسپرم‌گیری مشاهده می‌گردد.

طبق آزمون کرویت موخلی (Mauchly's test of Sphericity) و با توجه به جدول آنالیز واریانس برای فاکتور درون موردی مراحل سه‌گانه اسپرم‌گیری، مقدارF بدست آمد. با توجه به جدول آنالیز واریانس برای فاکتور درون موردی بین سه مرحله اسپرم‌گیری اختلاف معنی‌دار آماری از نظر فاکتورهای حجم اسپرم ($F_{(۲/۲۸)}$ = ۶/۲۳۷) تحرک اسپرم ($F_{(۲/۲۸)}$ = ۳۵/۳۰۱) و مورفولوژی اسپرماتوزوئید (درصد ناجورها)
($F_{(۲/۲۸)}$ = ۱۴۱/۹۴۳) مشاهده گردید (P<۰/۰۵). با توجه به آزمون بن فرونی (Bonferroni) مشخص گردید که بین مراحل اول و سوم از نظر حجم اسپرم و مراحل ذیل بصورت دو به دو از نظر تحرک اسپرم و مورفولوژی اسپرماتوزوئید (درصد ناجورها) اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده می گردد:

(مرحله اول – مرحله دوم)، (مرحله اول – مرحله سوم) و (مرحله دوم – مرحله سوم)

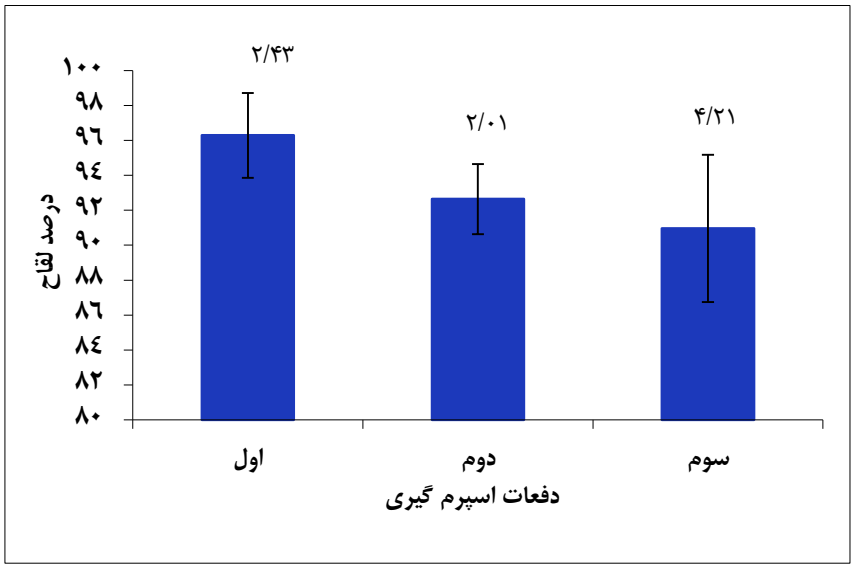
[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-23]

در حالیکه طبق آزمون‌های فوق اختلاف معنی‌دار آماری بین سه مرحله اسپرم‌گیری از نظر فاکتورهای تراکم اسپرم (۰/۳۷۹ = $F_{(۱/۲۱۸, ۱۷/۰۵۴)}$) و میزان اسپرماتوکریت (۰/۵۵۶ = $F_{(۲/۲۸)}$) وجود نداشت ($P>۰/۰۵$).

جدول ۳: میانگین بررسی کیفیت اسپرم مولدین نر ماهی آزاد وحشی (*Salmo trutta caspius*) در ۳ مرحله نمونه‌گیری (سال ۱۳۸۸).

مرحله نمونه‌گیری / پارامتر	اول	دوم	سوم
تراکم اسپرم (میلیون در میلی‌متر مکعب)	۲۳/۲۸ ± ۲/۲	۲۲/۶۹ ± ۱/۸۶	۲۰/۸۳ ± ۸/۶۱
اسپرماتوکریت (درصد)	۴۰/۶ ±۲/۴۴	۴۰/۵۶±۲.۱۷	۳۹/۹۳±۳.۰۶
حجم اسپرم (میلی‌لیتر)	۲/۲۷ ± ۰/۶۷	۱/۹۳ ± ۱/۰۲	۱/۰۸ ± ۰/۹۵
تحرک اسپرماتوزوئید (ثانیه)	۲۳/۲۷ ±۱/۸۷	۲۰/۸۷ ± ۲/۱	۱۸/۲۷ ± ۲/۵۲
مورفولوژی اسپرماتوزوئید (درصد ناجورها)	۱۸/۴۳ ± ۴/۲۹	۲۱/۵۳ ± ۲/۲	۳۱/۷۳ ± ۴/۸

نتایج نشان داد که بیشترین درصد لقاح (شکل ۱)، درصد چشم زدگی (شکل ۲)، درصد تفریخ (شکل ۳) و درصد بازماندگی لارو تا جذب کیسه زرده (شکل ۴) در مرحله اول اسپرم‌گیری مشاهده می‌گردد.

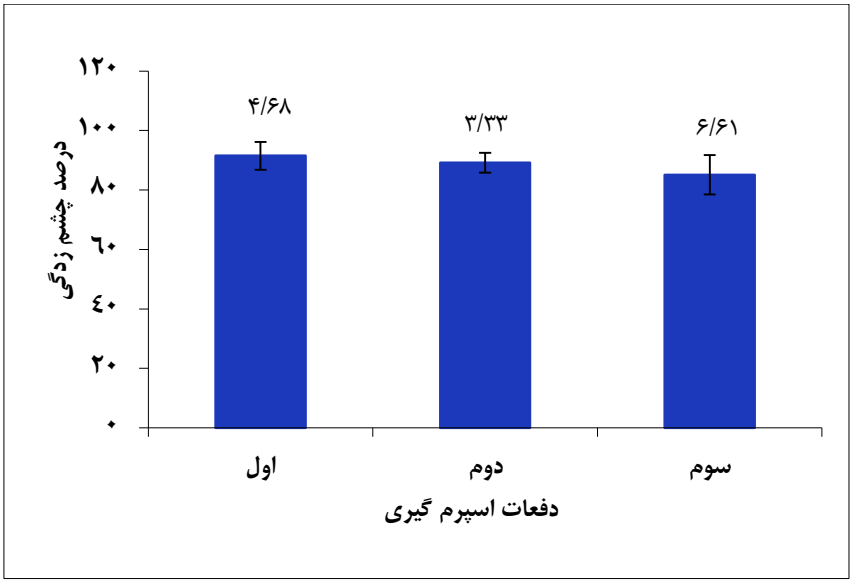


شکل ۱: درصد لقاح مولدین نر ماهی آزاد وحشی (*Salmo trutta caspius*) در ۳ مرحله نمونه‌گیری (سال ۱۳۸۸)

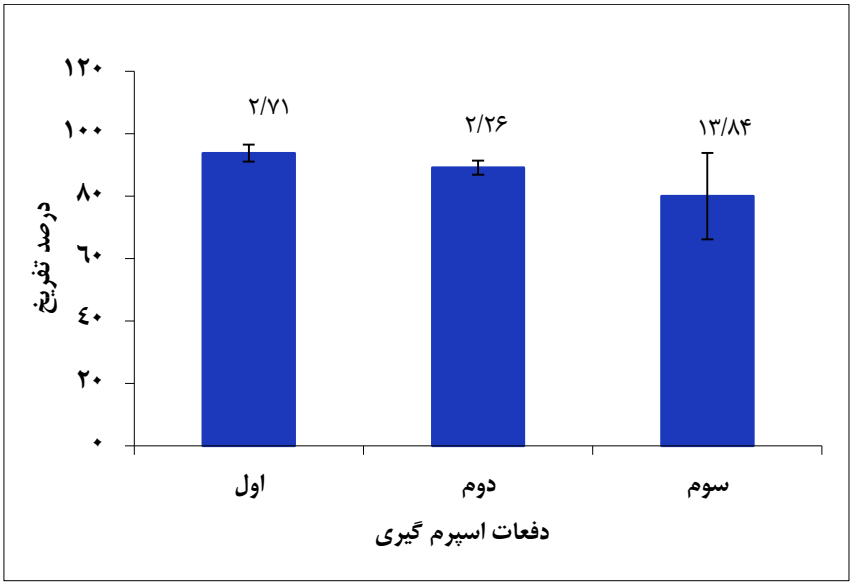
طبق آزمون کرویت موخلی (Mauchly's test of Sphericity) و با توجه به جدول آنالیز واریانس برای فاکتور درون موردی مراحل سه‌گانه اسپرم‌گیری، مقدارF بدست آمد. با توجه به جدول آنالیز واریانس برای فاکتور درون موردی بین سه مرحله اسپرم‌گیری اختلاف معنی‌دار آماری از نظر فاکتورهای درصد لقاح (۲۰/۹۴۲ = $F_{(۱/۴۴۸, ۲۰/۲۶۷)}$)، درصد چشم‌زدگی (۶/۷۱۲ = $F_{(۱/۴۱۱, ۱۹/۷۵۵)}$) و فاکتور درصد تخم‌گشایی (۹/۷۶۶ = $F_{(۱/۰۶۷, ۱۴/۹۴۵)}$) مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$). با توجه به آزمون بن فرونی (Bonferroni) مشخص گردید که بین مراحل (اول – دوم) و (اول – سوم) بصورت دو به دو از نظر درصد لقاح، مراحل اول و سوم از نظر درصد چشم‌زدگی و مراحل (اول – سوم) و (دوم – سوم) از نظر درصد تخم‌گشایی اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده می‌گردد.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-23]

با توجه به جدول آنالیز واریانس برای فاکتور درون موردی بین سه مرحله اسپرم‌گیری از نظر فاکتور درصد بازماندگی لارو تا مرحله جذب کیسه زرده اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نمی‌گردد ($P>0/05$ و $F_{(2/28)} = 1/238$).

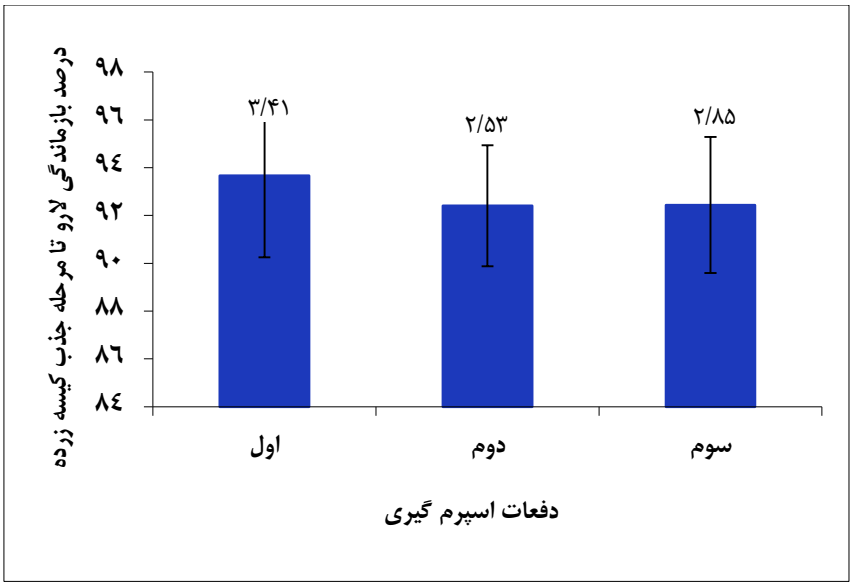


شکل ۲: درصد بازماندگی تخم‌ها تا مرحله چشم‌زدگی مولدین نر ماهی آزاد وحشی (*Salmo trutta caspius*) در ۳ مرحله نمونه‌گیری (سال ۱۳۸۸)



شکل ۳: درصد تفریخ مولدین نر ماهی آزاد وحشی (*Salmo trutta caspius*) در ۳ مرحله نمونه‌گیری (سال ۱۳۸۸)

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-23]



شکل ٤: درصد بازماندگی لارو تا مرحله جذب کیسه زرده مولدین نر ماهی آزاد وحشی (*Salmo trutta caspius*) در ۳ مرحله نمونه‌گیری (سال ۱۳۸۸)

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج بدست آمده اسپرم‌گیری‌های مکرر پس از رسیدگی جنسی، روی میزان درصد تحرک و طول دوره تحرک اسپرم تأثیر منفی می‌گذارد. این نتیجه روی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Buyukhatipoglu and Holtz, 1984) تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) (دادرس، ۱۳۸۸) به اثبات رسیده است. با توجه به نتایج حاصله در ماهی آزاد وحشی میانگین درصد اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم در مرحله اول بیشتر از مرحله دوم و سوم بود. اما این دو فاکتور در ماهی آزاد وحشی در ۳ مرحله تحقیق اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ($p>0/05$). در صورتیکه وقتی فاصله اسپرم‌گیری افزایش یافت، حجم و تحرک اسپرم کاهش معنی‌داری نشان داد و به ترتیب در ماهی آزاد وحشی از ۰/۶۷ ± ۲/۲۷ به ۰/۹۵ ± ۱/۰۸ میلی لیتر و از ۱/۸۷ ± ۲۷/۲۳ به ۲/۵۲ ±۲۶/۱۸ ثانیه رسید.

نتایج نشان داد که با جلو رفتن فصل تولید مثل در ماهی آزاد وحشی، تراکم، اسپرماتوکریت، تحرک و حجم اسپرم کاهش و درصد ناجورهای اسپرماتوزوئید افزایش یافت. در بررسی Munkittrick و Moccia (۱۹۸۷) روی منی قزل‌آلای رنگین کمان نتایج مشابهی در خصوص اسپرماتوکریت، تحرک اسپرم بدست آمد که با افزایش غلظت اسپرم پارامترهای کیفی اسپرم از قبیل تحرک اسپرماتوزوآ، درصد سلول‌های متحرک، حرکت رو به جلو و مستقیم اسپرماتوزوآ کاهش یافت. مشابه این نتیجه توسط Babiak و همکاران (۲۰۰۶) روی ماهی *Hippoglossus hippoglossus* بدست آمد.

در این بررسی با کاهش فاصله زمانی در اسپرم‌گیری‌ها، حجم و مدت زمان تحرک اسپرم افزایش و غلظت اسپرم کاهش یافت. مشابه این نتیجه روی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Buyukhatipoglu and Holtz, 1984) و ماهی turbot (Suquet *et al*., 1992) بدست آمد.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-23]

تغییرات سالیانه خصوصیات اسپرم قزل‌آلاهای جوان در طول فصل تولید مثل توسط Aral و همکاران (۲۰۰۵) بررسی شد و در این مطالعه نمونه‌برداری هر ۱۵ روز یکبار صورت گرفت. در طول فصل تولید مثل، درصد سلول‌های فعال اسپرم به طور معنی‌داری بهبود یافت. نتایج تحقیق حاضر نیز در ارتباط با افزایش زمان تحرک در طول دوره بررسی، یافته‌های این تحقیق را تائید می‌نماید.

حسینی و همکاران (۱۳۸۷) در تحقیق مشابهی روی ماهی قزل آلای رنگین کمان نشان دادند که در سن $^{+}$۳ سالگی که غلظت اسپرم کاهش می‌یابد، فواصل بین اسپرم‌گیری، تاثیر خود را واضح‌تر نشان می‌دهد و نتیجه آن، حصول اختلاف معنی‌دار در میزان اسپرماتوکریت در تیمارهای متفاوت اسپرم‌گیری می‌باشد. در این سن، زمانی که فاصله اسپرم‌گیری‌ها به ۱۴ روز یکبار می‌رسد، فرصت توان تولید بالای اسپرم و افزایش غلظت اسپرم به مولد داده می‌شود که نتیجه آن کاهش میزان تحرک است ولی زمانی که فواصل بین اسپرم‌گیری به ۷ روز در میان کاهش می‌یابد، مولدین این سن دیگر قادر به اصلاح کیفیت اسپرم خود جهت حصول درصد چشم‌زدگی بالا نمی‌باشند. اما زمانی که فواصل اسپرم‌گیری در این سن به ۱۰ روز در میان می‌رسد، افزایش میزان غلظت اسپرم، اثر کاهش تحرک را در لقاح پوشش داده است که نتیجه آن عدم اختلاف معنی‌دار تیمارهای ۱۴ روز و ۱۰ روز در میان اسپرم‌گیری است. در تحقیق حاضر نیز نتایج مشابه تحقیق فوق بوده است.

اثر نسبت اسپرم به تخمک و مدت زمان تماس گامت‌ها با هم بر روی موفقیت لقاح در ماهی *Gadus morhua* توسط Ian و همکاران (۲۰۰۹) مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیقات نشان داد که بین میزان اسپرماتوکریت و غلظت اسپرم (بوسیله سنجش با هموسایتومتر)، یک ارتباط خطی، مثبت و معنی‌داری وجود دارد ($r = ۰/۸۱۷, P = ۰/۰۰۱$). همچنین این محققان گزارش نمودند که سنجش اسپرماتوکریت به عنوان پارامتری در سنجش غلظت اسپرم، یک روش مطمئن و سریع در ارزیابی غلظت اسپرم این گونه می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر یافته‌های این تحقیق را تایید می‌کند.

ارتباط بین وضعیت بدن، پارامترهای کیفی اسپرم و موفقیت لقاح در قزل‌آلای رنگین‌کمان توسط Bozkurt (۲۰۰۶) بررسی شد. نتایج نشان داد که بین تحرک و میزان لقاح ($r = ۰/۹۳۴, P < ۰/۰۱$) ارتباط مثبت و معنی‌داری برای همه نمونه‌ها مشاهده شد ($P < ۰/۰۱$,$r = ۰/۷۴۲$). نتایج تحقیق حاضر یافته‌های تحقیق فوق را در مورد رابطه بین تحرک و میزان لقاح و به دنبال آن چشم‌زدگی را تائید می‌نماید.

در تحقیق حاضر در ماهی آزاد وحشی بالاترین درصد لقاح (۹۶/۲۹ درصد) و درصد چشم‌زدگی (۹۱/۵۲ درصد) در مرحله اول بوده که تحرک اسپرم ۲۷/۲۳ ثانیه اندازه‌گیری شد. اما کمترین درصد لقاح (۹۰/۹۶ درصد) و درصد چشم زدگی (۸۵/۱۳ درصد) در مرحله آخر اسپرم‌گیری و با مدت زمان تحرک ۲۷/۱۸ ثانیه مشاهده شد. مشابه این نتیجه در بررسی دادرس (۱۳۸۸) بدست آمد.

این تحقیق نیز همانند تحقیقات گذشته که روی سایر ماهیان انجام شد، بهبود کیفیت اسپرم در اولین مرحله اسپرم‌گیری را با توجه به کاهش حجم و تحرک اسپرم در مرحله دوم و سوم اسپرم‌گیری، تأیید کرده و بهتر است در صورت استفاده از مولدین وحشی و پرورشی ماهی آزاد دریای خزر با توجه به اهمیت ماهی آزاد، از آن‌ها فقط یکبار اسپرم‌گیری شود. نتایج این تحقیق می‌تواند راهکار مناسبی جهت افزایش کارایی تکثیر مصنوعی ماهی آزاد دریای خزر و افزایش بازماندگی لاروهای حاصله از آن‌ها در جهت احیاء بازسازی ذخائر این گونه ارزشمند باشد.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-23]

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان و کلیه کارکنان مرکز تکثیر، پرورش و بازسازی ذخایر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت نهایت تشکر و سپاس را داریم.

منابع

ایزدی، ع.، ۱۳۷۱. بررسی اسپرم تاس‌ماهیان و طرز نگهداری اسپرم در ماهیان مختلف. پایان‌نامه کارشناسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی کرج. ۹۳ ص.

پاشازانوسی، ع.، ۱۳۸۳. کتابچه معرفی مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت، موسسه رویت سازان.۴۶ ص.

جمالزاده، ح.ر.، ۱۳۸۰. زیست شناسی و اکولوژی آزاد ماهی دریای خزر، سمینار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. ۶۵ ص.

حسینی، ش، خارا، ح. و لرستانی، ر.، ۱۳۸۸. اثر فواصل اسپرم‌گیری مولدین سنین مختلف قزل‌آلای رنگین کمان بر تحرک اسپرم، اسپرماتوکریت و چشم-زدگی تخم. مجله شیلات، سال سوم، شماره سوم، پاییز ۸۸.

دادرس، ح.، ۱۳۸۸. تأثیر اسپرم‌گیری مجدد بر روی برخی پارامترهای اسپرم‌شناختی تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان.۱۲۱ ص.

کازانچف، الف. ن.، ۱۹۸۱. ماهیان دریای خزر و حوضه آبریز آن. ترجمه: شریعتی، ا.، ۱۳۸۳، شرکت سهامی شیلات ایران. ۱۷۱ ص.

لرستانی، ر.، ۱۳۸۳. اثر سن مولد نر و محلول‌های تقویت کننده بر مدت زمان تحرک اسپرم و میزان باروری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، ۶۷ ص.

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

Alavi, S. M. H., Cosson, J. and Kazemi, R., 2006. Semen characteristics in *Acipenser persicus* in relation to sequential stripping. Applied Ichthyology, 22:400-405.

Aral, F., Sahynoz, E. and Dogu. Z., 2005. Annual changes in sperm characteristics of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) during spawning season in Ataturk Dam Lake, Sanliurfa, Turkey: Journal-of-Animal-and-Veterinary-Advances. 2005; 4(2): 309-313.

Babiak, I., Ottesen, R., Rudolfsen, O. and Johnsen, S., 2006. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season. Theriogenology. Res. 65 : 1587–1604.

Billard, R. and Gillet, C., 1981. Aging of eggs and temperature potentialization of micropollutant effecs of the aquatic medium on trout gamets. Cah. Lab. Hydrobiol. Montreau,12 : 35-42.

Bobe, J. and Labbé, C., 2009. Egg and sperm quality in fish .General and Comparative Endocrinology, 165:535-548.

Bozkurt, Y., 2006. Relationship between body condition and spermatological properties in scaly carp (*Cyprinus carpio*) semen: Journal-of-Animal-and-Veterinary-Advances. 2006; 5(5): 412-414.

Bromage, N. R. and R. Cumaranataunga, R., 1988. Egg production in the rainbow trout, In Recent advances in Aquaculture, vol: 3., Muir, J. F, R. J., Robert, Eds, pp: 63-139.

Buyukhatipoglu, S. and Holtz, W., 1984. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. Aquaculture. 37: 63-71.

Cabrita, E., Anel, L. and Herraéz., P. M., 2001. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved trout sperm. Theriogenology , 56: 623-635.

Dettlaff, T. A., Ginsburg, A. S. and Schmalchausen, O. I., 1993. Sturgeon fishes. In: Developmental Biology and Aquaculture, Springer-Verlag, Berlin, pp. 67–71.

Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Shaliutina, A ., Rodina, M ., Yamaner, G ., Gela, D., Dzyuba, V. and Linhart, O., 2012. Spermatozoa motility, cryoresistance, and fertilizing ability in sterlet *Acipenser ruthenus* during sequential stripping. Aquaculture, 272–278

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-23]

Gage, M. J. G., Stockley, P. and Parker. G. A., 1995. Effects of alternative male mating strategies on characteristics of sperm production in the Atlantic salmon (*Salmo salar*): theoretical and empirical investigations. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 350: 391-399.

Gjerde, B., 1984. Variation in semen production of farmed Atlantic salmon and rainbow trout. Aquaculture, 40: 109-114.

Hajirezaee, S., Mojazi Amiri, B. and Mirvaghefi, A. R., 2009. Effects of Stripping Frequency on Semen Quality of Endangered Caspian Brown Trout, *Salmo trutta caspius* . Animal and Veterinary Sciences 4: 65-71.

Ian, A. E., Matthew, A. T. and Litvak, K., 2009. The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod Gadus morhua L. Aquaculture. 286 (2009) 89–94.

Kjorsvik, E., Mangor-Jensen, A. and Holmetjord, I., 1990. egg quality in fishes. In : Blaxter, J.H.S., Southward, A.J.(Eds.), Adv. Mar. Biol., 26:71-113. D.J.,

Liley, N. R., Tamkee, P., Tsai, R. and Hoysak. 2002. Fertilization dynamics in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)*: Effect of male age, social experience, and sperm concentration and motility on invitro fertilization. Can. J. Fish. Aquat. Sci./J. Can. Sci. Halieut. Aquat. Vol. 59, no. 1, pp. 144-152.

Moon, S. H., Kwon, Y. J., Lee, K. J. and Chang, J. Y., 2003. Increased plasma 17 -hydroxyprogesterone and milt production in response to gonadotropin - releasing hormone agonist in captive male starry flounder, *Platichthys stellatus*. Aquaculture, 218: 703-716.

Munkittrick, K. R. and Moccia, R. D., 1987. Seasonal changes in the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: Effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constituents. Aquaculture. 1987. vol. 64, no. 2, pp. 147-156.

Obraztsov, A. N., 1985. Estimation of sperm concentration in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich). Genetic and ecological implication in fish culture. pp. 111-116.

Piironen, J., 1985. Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar* M. sebago girard) during a spawning season. Aquaculture, 48: 337-350.

Piros, B., Glogowski, J., Kolman, R., Rzemieniecki, A., Domagala, J., Horvath, A., Urbanyi, B. and Ciereszko, A., 2002. Biochemical characterization of Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*,and starlet,*Acipenser ruthenus*,milt plasma and spermatozoa. Fish Physiology and Biochemistry , 26, 289-295.

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

Rana, K. J., 1995. Preservation of gametes. Cambridge: Cambridge University Press. Brood Stock Management and Egg and Larvae Quality, pp: 53-76.

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.

Sanchez-Rodriguez, M., Escaffre, A. M., and Reinaud, P., 1978. The spermiation period in the rainbow trout_Salmo gairdneri. Plasma gonadotropin and androgen levels, sperm production and biochemicalchanges in the seminal fluid. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 18: 943-948.

Shaliutina, A., Dzyuba, B., Hulak, M., Boryshpolets, S., Li1, P. and Linhart, O., 2012. Evaluation of Spermiation Indices with Multiple Sperm Collections in Endangered Sterlet (*Acipenser ruthenus*). Reprod Dom Anim 47, 479–484.

Suquet, M., Omnes, M. H., Normant, Y. and Fauvel, C., 1992. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture. 1992. vol. 101, no. 1-2, pp. 177-185.

Tekin, N., Seçer, S., Akçay, E., Bozkurt, Y. and Kayam, S., 2003. The effect of age on spermatological properties in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792). Türk. J. Vet. Anim. Sci ., 27: 37-44.

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

Vladi, T. V. Afzelius, B. A. and G. E. Bronnikov. G. E., 2002. Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories. Biology of Reproduction, 66: 98-105.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-23]

Wagner, E., Arndt, R. and Hilton, B., 2002. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout brood stock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. Aquaculture, 211: 353–366.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-23]