مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۳، ۲۲۵-۲۱۹
Original Article
Journal of Veterinary Research. 69,3:219-225, 2014

تأثیر یون‌های منیزیم و کلسیم در محلول نمکی بیلارد بر تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)

مهدی طالبی دارابی [۱] هومن رجبی اسلامی [۱*] ابوالقاسم کمالی [۱] بهروز بهرامیان [۲]
۱) گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران ـ ایران
۲) مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی کشور، تنکابن ـ ایران

(دریافت مقاله: ۱۷ فروردین ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۴ تیر ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: محلول‌های فعال‌کننده نمکی مختلفی برای القای تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در شرایط مصنوعی استفاده می‌شوند که البته کارایی آنها با ابهاماتی نیز همراه است. **هدف:** پژوهش حاضر به مطالعه تأثیر تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف کلسیم، منیزیم و تغییر pH در محلول نمکی بیلارد بر میزان تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداخت. **روش کار:** ۱۰ قطعه مولد نر قزل‌آلای رنگین‌کمان انتخاب و برای دو هفته با شرایط کارگاهی سازگار شدند. محلول‌های فعال‌کننده نیز با افزودن ۱، ۲ و ۳ mmol/L کلسیم و منیزیم به محلول بیلارد تهیه گردیدند. سه تیمار دیگر نیز تنها با تغییر میزان pH محلول بیلارد از ۹ برابر ۸، ۸/۵ و ۹/۵ توسط سودسوز آور آماده شد. مولدین سپس به‌سالن تکثیر انتقال یافته و پس از بی‌هوشی از آنها اسپرم‌گیری به عمل آمد. نمونه‌های اسپرم در ادامه با یکدیگر مخلوط گردیدند تا اثر کیفیت متفاوت اسپرم‌ها ناشی از اختلافات ژنتیکی بین مولدین حذف گردد. سپس مدت زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان در هریک از تیمارهای آزمایشی با سه تکرار تعیین و با محلول بیلارد (تیمار شاهد) مقایسه شد. **نتایج:** تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان در تمام تیمارهای آزمایشی به‌شکل معنی‌داری بیش از تیمار شاهد بود ($p<0/01$). بیشترین زمان تحرک اسپرم با ۶/۷±۱۰۵/۰ s در تیمار حاوی ۱ mmol/L کلسیم به دست آمد، در حالی که کمترین میزان تحرک با ۴/۵۰±۳۱/۳۳ s در تیمار شاهد (محلول بیلارد با pH برابر ۹) ثبت گردید. تیمارهای حاوی کلسیم بیش از سایر تیمارهای مطالعاتی بر تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان تأثیرگذار بودند، هرچند که تفاوت معنی‌داری در تحرک اسپرم بین تیمار ۳ mmol/L کلسیم و ۳ mmol/L منیزیم دیده نشد ($p<0/01$). همچنین یک روند نزولی در زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان با افزایش pH در تیمارها مشاهده شد، به طوری که بالاترین زمان تحرک اسپرم در تیمار pH برابر ۸ و کمترین مدت زمان تحرک اسپرم نیز در تیمار pH برابر ۹/۵ به دست آمد. **نتیجه‌گیری نهایی:** یافته‌های این پژوهش نشان داد که اصلاح محلول‌های فعال‌سازی اسپرم با کمک هریک از یون‌های دوظرفیتی کلسیم و منیزیم و تنظیم میزان اسیدیته می‌تواند به بهبود کارایی تکثیر در کارگاه‌های تکثیر قزل‌آلای رنگین‌کمان منجر شود.

واژه‌های کلیدی: کاتیون‌های دوظرفیتی، اسپرماتوکریت، تحرک اسپرم، *Oncorhynchus mykiss*

مقدمه

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) از گونه‌های بومی آمریکای شمالی است که با هدف تولید پروتئین و صید تفریحی به شکل گسترده‌ای در کشورهای مختلف نیم‌کره شمالی و جنوبی پرورش داده می‌شود (۲۱). رشد سریع و ضریب تبدیل غذایی پایین همراه با ظاهری بازارپسند باعث توسعه سریع صنعت پرروش قزل‌آلای رنگین‌کمان در مقایسه با سایر آبزیان پرورشی گردیده است (۲۰). کشورهای مختلفی طی سال‌های اخیر به تولید انبوه تخم و ماهی پرواری قزل‌آلای رنگین‌کمان اقدام نموده‌اند که از آن جمله می‌توان به نروژ، شیلی، انگلستان، کانادا، جزایر فارو، آمریکا، استرالیا، فنلاند، ژاپن و همچنین ایران اشاره نمود (۱۶).

استمرار یک صنعت آبزی‌پروری پایدار بر پایه تولید نسل‌های متمادی با کیفیت مناسب می‌باشد. بنابراین بررسی توان باروری مولدین و کاربرد گامت‌هایی با کیفیت بالا از اهمیت زیادی در تولید لارو مناسب برای تأمین نیازهای بازار برخوردار است (۱۶). کیفیت تخمک به طور معمول در صنعت آبزی‌پروری مورد ارزیابی قرار گرفته و به خصوصیات اسپرم توجه چندانی نمی‌گردد. این در حالی است که کیفیت هر دو نوع گامت می‌تواند یک لقاح موفق و تولید لاروهایی با کیفیت مناسب را رقم بزند (۱۱،۱۶).

حجم، تراکم و تحرک اسپرم همراه با میزان اسپرماتوکریت از جمله متغیرهایی هستند که به طور معمول جهت ارزیابی کیفیت اسپرم استفاده می‌شوند (۵،۱۴،۱۹). اسپرماتوزوآی اغلب ماهیان نظیر آزادماهیان، کپورماهیان، ماهیان خاویاری و بیشتر ماهیان دریایی در بیضه و مایع منی بی‌تحرک بوده (۲،۱۸) و تحرک آنها بعد از رهاسازی اسپرم به محیط آبی در تکثیر طبیعی یا درون رقیق‌کننده‌ها در تکثیر مصنوعی شروع می‌شود. ارتباط آشکاری بین مایع پلاسمایی و اسمولالیته رقیق‌کننده‌های تحرک اسپرم وجود دارد (۴). پارامترهای مختلفی نظیر یون‌های محلول (پتاسیم، سدیم و کلسیم)، میزان pH، فشار اسمزی و دمای آب بر تحرک اسپرم اثرگذار هستند (۹،۱۳). بررسی‌ها نشان می‌دهد که پتاسیم از یون‌های کلیدی در کنترل تحرک اسپرم در بیضه آزاد ماهیان و ماهیان خاویاری است (۱۰). همچنین کاتیون‌هایی نظیر کلسیم و منیزیم دارای

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۱-۴۴۸۶۵۴۷۴، نمابر: ۰۲۱-۴۴۸۶۵۴۶۴ Email: rajabi.h@srbiau.ac.ir

اثرات رقابتی بر رفتار اسپرم در مایع اسپرمی هستند، به طوری که تحرک اسپرماتوزوآ در ماهیان با میزان اسمولالیته و غلظت یون‌ها کنترل می‌شود (۱).

تحقیقات زیادی در ارتباط با کیفیت اسپرم گونه‌های مختلف ماهیان انجام شده است. با این وجود مطالعه جامعی در رابطه با میزان تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تأثیر یون‌های دو ظرفیتی صورت نپذیرفته است. پژوهش حاضر بر این اساس به بررسی تأثیر تیمارهای مختلف حاوی غلظت یون‌های کلسیم و منیزیم در محلول نمکی بیلارد بر میزان تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداخت. همچنین تأثیر تیمارهای دارای pH مختلف نیز به عنوان یکی دیگر از عوامل شیمیایی مؤثر بر تحرک اسپرم این ماهی مطالعه شد.

مواد و روش کار

تحقیق حاضر در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی واقع در شهرستان کلاردشت استان مازندران در بهار سال ۱۳۹۱ صورت گرفت. تعداد ۱۰ قطعه مولد نر چهار ساله قزل‌آلای رنگین‌کمان برای این منظور به صورت تصادفی انتخاب و برای مدت دو هفته در دو حوضچه مستطیلی به ابعاد ۳×۲×۱۰ m با شرایط محیطی کارگاه سازگار شدند. تغذیه ماهیان در زمان سازگاری به صورت یکسان با کمک غذای معمول و مورد استفاده در کارگاه برای مولدین انجام گرفت.

آماده‌سازی محلول‌های آزمایشی: محلول نمکی بیلارد (۲) شامل ۱۲۵ mmol/L کلرید سدیم، ۳۰ mmol/L گلیسین، ۲۰ mmol/L تریس-اسید کلریدریک ۱٪ که pH آن طبق پیشنهاد بیلارد با کمک سود سوزآور یک نرمال برابر ۹ تنظیم شد، به عنوان تیمار شاهد انتخاب گردید. دیگر تیمارهای آزمایشی با افزودن غلظت‌های ۱ mmol/L، ۲ و ۳ کلرید کلسیم و همچنین ۱ mmol/L، ۲ و ۳ کلرید منیزیم به محلول نمکی بیلارد تهیه گردید. سه تیمار دیگر نیز تنها با تنظیم میزان pH در محلول بیلارد برابر ۸، ۸/۵ و ۹/۵ با کمک سود سوزآور آماده شدند. بنابراین تعداد ۹ محلول (تیمار) مختلف در این تحقیق استفاده گردید که تعداد آنها همراه با تیمار بیلارد به عنوان شاهد به ۱۰ تیمار با سه تکرار رسید.

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده برای آماده‌سازی محلول‌های نمکی از شرکت مرک (Merck، Germany) تهیه گردید. هر یک از ترکیبات در محلول‌های نمکی به دقت بر حسب میلی مول بر لیتر اندازه‌گیری و اضافه شدند. سپس تمام ترکیبات مربوط به هر یک از محلول‌ها درون یک بالن ژوژه تمیز ریخته شده، با آب دیونیزه به حجم ۱L رسیده و در انتها توسط یک همزن مغناطیسی به خوبی حل شدند. میزان pH محلول‌ها نیز در انتها با کمک سود سوزآور یا اسید کلریدرک رقیق برابر ۹ تنظیم گردید.

جمع‌آوری اسپرم: تمام مولدین نر پس از معاینه ظاهری رسیدگی جنسی برای اسپرم‌گیری به سالن تکثیر انتقال یافته و پس از بی‌هوشی با ppm ۱۰۰ محلول MS222 توسط یک پارچه تمیز به خوبی خشک شدند تا از ورود آب به مایع منی و تحرک احتمالی اسپرم ناشی از فعال‌سازی در محیط رقیق ممانعت گردد. اسپرم‌گیری از هر یک از مولدین بعد از زیست‌سنجی و با انجام ماساژ شکمی صورت پذیرفت. جمع‌آوری اسپرم برای جلوگیری از آلودگی‌های احتمالی به مواد زائد و کاهش کیفیت اسپرم با کمک سرنگ‌های ۵ mL استریل انجام شد. اسپرم‌ها پس از جمع‌آوری از تمام مولدین (۱۰ عدد) به خوبی با یکدیگر مخلوط شد تا محلول همگنی از آنها به دست آید. به این ترتیب اثر کیفیت متفاوت اسپرم‌ها ناشی از وجود اختلاف ژنتیکی بین مولدین حذف و اسپرم مورد استفاده برای کلیه تیمارها و تکرارها دارای ویژگی‌های یکسانی بود. سپس مقدار ۳ mL از مخلوط اسپرم‌ها درون یک لوله آزمایش ریخته شده و با کمک یخ خشک برای اندازه‌گیری خصوصیات کیفی اسپرم شامل میزان تراکم و حجم اسپرماتوکریت به آزمایشگاه انتقال یافت، در حالی که تحرک اسپرم‌ها در محل اسپرم‌گیری و با کمک باقیمانده اسپرم‌ها تعیین گردید.

تعیین خصوصیات کیفی اسپرم (تراکم اسپرم): اسپرم‌ها برای این منظور توسط سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ به نسبت ۱:۱۰۰۰ رقیق شده و میزان ۵μL از آنها توسط میکروپیپت به لوله‌های آزمایش حاوی ۵۰۰۰ μL سرم فیزیولوژی اضافه گردید. مخلوط حاصله چندین بار تکان داده شد تا به طور کامل همگن شود. سپس ۱۰ μL از محلول با کمک میکروپیپت روی لام هموسیتومتر ریخته شده و لامل مخصوص با زاویه 45^{o} روی آن قرار گرفت. محلول رقیق شده اسپرم با این کار به طور کامل روی لام پخش و با بزرگنمایی ×۴۰۰ میکروسکوپ نوری قابل شمارش گردید.

تعداد ۳۲ خانه کوچک از کل خانه‌های روی لام هموسیتومتر (۴ ردیف ۴ تایی برابر ۱۶ خانه بزرگ که هر یک از خانه‌ها خود به ۱۶ قسمت مساوی کوچکتر تقسیم شده‌اند) به طور تصادفی جهت شمارش اسپرم انتخاب گردید. عدد به‌دست آمده از شمارش اسپرم‌ها در رابطه زیر قرار گرفته و تراکم اسپرم بر اساس No./mL محاسبه گردید که X در آن برابر تعداد اسپرماتوزوآ در هر mL اسپرم و A برابر مجموع اسپرم در ۵ خانه از لام هموسیتومتر بود (۷):

$$X=A\times5\times10000\times1000$$

حجم اسپرماتوکریت: اسپرماتوکریت نمونه اسپرم بلافاصله بعد از انتقال به آزمایشگاه اندازه‌گیری شد. اسپرم برای این کار داخل لوله‌های میکروهماتوکریتی قرار گرفت که یک سر آنها با خمیر بسته شده بود. لوله‌ها برای به مدت ۱۰ min با سرعت ۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ شده و میزان اسپرماتوکریت با تقسیم نسبت حجم ماده سفید فشرده به حجم کل اسپرم به صورت درصد تعیین گردید (۱۶).

تعیین میزان تحرک اسپرم تحت تأثیر تیمارهای مختلف: ارزیابی تحرک اسپرم (مدت تحرک اسپرم) در هریک از تیمارهای حاوی فعال‌کننده نمکی به روش نیمه‌کمی با کمک میکروسکوپ نوری معمولی مجهز به دوربین فیلمبرداری صورت گرفت (۱۶). رقیق‌سازی اسپرم‌ها به نسبت

۱:۲۰ و در مرحله مشاهده میکروسکوپی انجام گرفت. ۱μL از اسپرم برای این کار با استفاده از میکروپیپت برداشته شد و داخل میکروتیوپی حاوی ۱۹μL از محلول فعال‌کننده نمکی مرتبط با همان تیمار قرار گرفت. مخلوط بلافاصله با چند تکان آرام همگن و ۱ μL از آن به سرعت روی لام هموسیتومتر مستقر زیر میکروسکوپ ریخته شد. ضبط ویدیویی از تحرک اسپرم‌ها همزمان با مرحله رقیق‌سازی انجام پذیرفت. مدت زمان تحرک اسپرم با بازبینی نوارهای ضبط شده به صورت زمان مورد نیاز برای از حرکت ایستادن ۹۵٪ از اسپرم‌ها به صورت درصد به دست آمد (۴).

تجزیه و تحلیل آماری: تمام متغیرهای مطالعاتی در این پژوهش شامل تراکم و تحرک اسپرم همراه با حجم اسپرماتوکریت برای هر یک از تیمارها به صورت میانگین±انحراف استاندارد حاصل از پنج بار تکرار به دست آمدند. اختلاف بین تیمارها با کمک آنالیز واریانس (ANOVA) تعیین و محل اختلافات بر اساس آزمون Tukeys HSD مشخص شد. سطح معنی‌داری در تمام آزمون‌ها برابر ۱٪ در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با کمک نرم‌افزار آماری SPSS انجام گرفته و نمودارها به کمک نرم‌افزار SigmaPlot رسم شدند.

نتایج

زیست‌سنجی از قزل‌آلای رنگین‌کمان در این تحقیق نشان داد که ماهیان آزمایشی دارای وزنی برابر ۱۰۷/۱۵±۱۹۹۶/۲۳ g بودند. همچنین میزان تراکم اسپرم نمونه‌ها برابر با $۶/۵۵±۰/۷۳×۱۰^{۶}$ /mL بود. میزان اسپرماتوکریت ماهیان آزمایشی نیز برابر ۲/۳±۲۹/۷٪ به دست آمد.

مدت زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تأثیر تیمارهای مختلف حاوی مقادیر مختلف کلسیم در مقایسه با تیمار شاهد (محلول بیلارد) در تصویر ۱ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که تحرک اسپرم در محلول‌هایی با هر سه غلظت ۱، ۲ و ۳ کلسیم به شکل معنی‌داری بیشتر از محلول بیلارد بود. بیشترین مدت زمان تحرک اسپرم با ۶/۷s±۱۰۵/۰ در تیمار نمکی حاوی ۱ mmol/L کلسیم به دست آمد که البته میزان آن در تیمارهای ۲ mmol/L و ۳ به ترتیب با ۴/۳s±۹۲/۵ و ۳/۸s±۷۰/۹ کاهش یافت، هرچند که اختلاف معنی‌داری در میزان تحرک اسپرم بین تیمارهای مختلف حاوی غلظت‌های مختلف کلسیم دیده نشد. کمترین میزان تحرک اسپرم با ۴/۵۰s±۳۱/۳۳ نیز در تیمار شاهد مشاهده گردید که البته اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارها نشان داد ($p<۰/۰۱$).

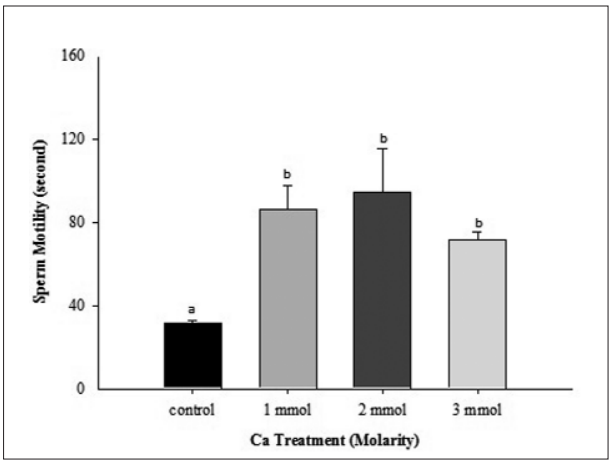
اختلاف معنی‌داری در میزان تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تأثیر تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف یون منیزیم به دست آمد، به طوری که افزایش معنی‌داری در تحرک اسپرم با افزایش غلظت یون منیزیم در تیمارهای آزمایشی اتفاق افتاد (تصویر ۲). مدت زمان تحرک اسپرم در تیمارهای ۱ mmol/L و ۲ منیزیم به ترتیب با ۵۴/۳۳s و ۵۸s به شکل معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد (۴/۵۰s±۳۱/۳۳) افزایش یافت، هرچند که اختلاف معنی‌داری بین این دو تیمار دیده نشد. این در حالی است که افزایش غلظت یون منیزیم در تیمار حاوی ۳ mmol/L موجب افزایش معنی‌دار زمان تحرک اسپرم به ۱/۶ s±۷۰/۰ در مقایسه با سایر تیمارهای حاوی منیزیم و محلول بیلارد گردید.

تغییرات میزان تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مقادیر مختلف pH نیز در تصویر ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که مدت زمان تحرک اسپرم در هر یک از تیمارهای آزمایشی با مقادیر متفاوت pH دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر بودند. بیشترین میزان تحرک اسپرم با ۸/۲ s±۴۹/۰ در تیمار فعال‌سازی با pH برابر ۸ به دست آمد. افزایش میزان اسیدیته به تدریج موجب کاهش مدت زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان گردید، به شکلی که حداقل زمان تحرک اسپرم در تیمار با pH برابر ۸/۵ حاصل شد که البته تفاوت معنی‌داری را با تیمار pH برابر ۹ نشان نداد.

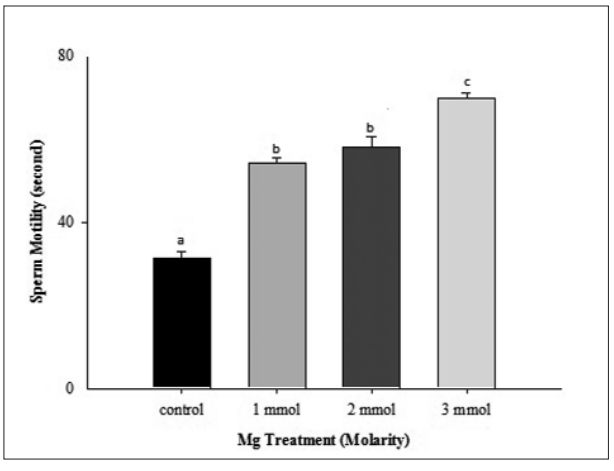
مقایسه تحرک اسپرم بین تمام تیمارهای آزمایشی نشان داد که تیمارهای حاوی کلسیم بیشترین تأثیر را در مدت زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد، به طوری که بیشترین زمان فعالیت در تیمار حاوی ۱ mmol/L کلسیم به دست آمد. همچنین اختلاف معنی‌داری در میزان تحرک اسپرم بین تیمار حاوی ۳ mmol/L کلسیم با تیمار حاوی ۳ mmol/L منیزیم دیده نشد. کمترین مدت زمان تحرک اسپرم نیز در بین تیمارهای آزمایشی با ۴/۵۰ s±۳۱/۳۳ به تیمار شاهد (محلول فعال‌سازی بیلارد) تعلق داشت که اختلاف معنی‌داری را تنها با تیمار دارای pH برابر ۹ نشان نداد.

بحث

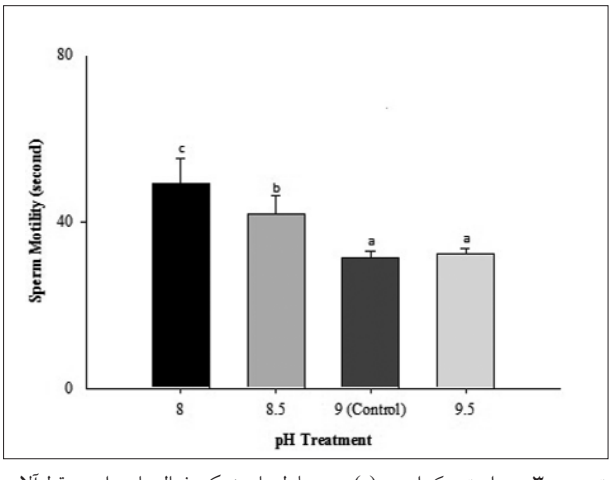
نتایج این پژوهش نشان داد که تمام فعال‌کننده‌های نمکی اسپرم، تأثیر معنی‌داری بر افزایش زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان دارند. با این وجود تیمارهای نمکی حاوی کلسیم از تأثیر به مراتب بیشتری در مقایسه با تیمارهای منیزیم و همچنین مقادیر مختلف pH برخوردار بودند. کلسیم از جمله یون‌های ضروری برای آغاز تحرک اسپرماتوزوآی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد که بیشترین نقش را در القای مدت زمان تحرک اسپرم با کاهش قطر حرکتی اسپرماتوزآ برخوردار است (۴،۶). همچنین افزایش غلظت خارج سلولی کلسیم قادر است که اثرات بازدارندگی یون پتاسیم بر تحرک اسپرم را از بین ببرد (۱۲). با این وجود یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که غلظت بالای یون کلسیم در محلول‌های نمکی می‌تواند به عنوان یک عامل محدودکننده باعث کاهش زمان تحرک اسپرم گردد. کاهش تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای حاوی ۲ mmol/L و ۳ کلسیم در مقایسه با تیمار ۱mmol/L کلسیم می‌تواند به تغییر شرایط اسمزی محلول‌های فعال‌کننده و صرف انرژی بیشتر توسط اسپرم برای برقراری تعادل اسمزی به جای استفاده از انرژی موجود در میتوکندری‌ها برای حرکت تاژک ارتباط



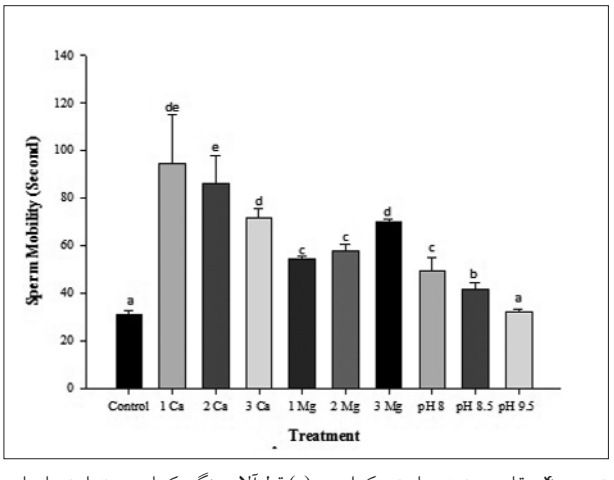
تصویر ۱. میزان تحرک اسپرم (s) در محلول‌های نمکی فعال‌سازی اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان حاوی مقادیر مختلف کلسیم. حروف انگلیسی مشابه روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۱٪ است.



تصویر ۲. میزان تحرک اسپرم (s) در محلول‌های نمکی فعال‌سازی اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان حاوی مقادیر مختلف منیزیم. حروف انگلیسی مشابه روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۱٪ است.



تصویر ۳. میزان تحرک اسپرم (s) در محلول‌های نمکی فعال‌سازی اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان حاوی مقادیر مختلف pH. حروف انگلیسی مشابه روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۱٪ است.



تصویر ۴. مقایسه مدت زمان تحرک اسپرم (s) قزل‌آلای رنگین‌کمان بین تمام تیمارهای آزمایشی. حروف انگلیسی مشابه روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۱٪ است.

داشته باشد (۸). با این وجود میزان تحرک اسپرم در تمام محلول‌های نمکی حاوی غلظت‌های مختلف کلسیم در این تحقیق بیش از تیمار شاهد (فاقد یون‌های کلسیم و منیزیم) بود.

اطلاعات کمی در مورد تأثیر یون منیزیم بر تحرک اسپرم در ماهیان وجود دارد. البته مطالعات محدود انجام شده در رابطه با فرآیندهای درون سلولی اسپرم بر نقش کلیدی منیزیم در آغاز فعال‌سازی تحرک اسپرم در ماهیان تاکید می‌نماید (۱۶). پژوهش حاضر نیز در تایید این یافته‌ها نشان داد که منیزیم بر افزایش مدت زمان تحرک اسپرم تأثیرگذار است که می‌تواند به دلیل تأمین نیاز اسپرم به این یون برای تداوم حرکت باشد (۱۶). همچنین مدت زمان کمتر تحرک اسپرم در تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف منیزیم در مقایسه با تیمارهای حاوی غلظت‌های متفاوت کلسیم نشان‌دهنده تأثیر تحریکی کمتر منیزیم برای فعال‌سازی تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان در مقایسه با یون کلسیم است. البته روند افزایشی تحرک اسپرم با افزایش غلظت یون منیزیم نشان می‌دهد که در صورت افزایش غلظت یون منیزیم می‌توان شاهد افزایش بیشتری در زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان در مقادیری حتی بیشتر از تأثیر کلسیم نیز بود.

میزان pH از دیگر عواملی است که بر کیفیت اسپرم گونه‌هایی نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان (۱۳) و ماراماهی خاردار (۱۷) تأثیرگذار است. ترشح یون بی‌کربنات به داخل مایع اسپرمی در زمان رسیدگی نهایی اسپرم و متعاقب آن افزایش pH اسپرم طی عبور از لوله اسپرم‌بر از عوامل مهم در توانایی تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد چام به حساب می‌آیند (۲). این پژوهش نیز در تایید یافته‌های پیشین نشان داد که میزان اسیدیته بر مدت زمان تحرک اسپرم تأثیرگذار است (۸،۱۵). بیشترین میزان تحرک اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان در این پژوهش در تیمار حاوی pH برابر ۸ به دست آمد و به تدریج یک روند کاهشی در مدت زمان تحرک اسپرم با افزایش میزان pH اتفاق افتاد. این در حالی است که بیلارد (۳)

بیشترین میزان تحرک اسپرم را در pH برابر ۹ گزارش کرده بودند. وجود اختلاف در تأثیر pH بر مدت زمان تحرک اسپرم در این تحقیق در مقایسه با مطالعات قبلی را می‌توان به سن مولدین، شرایط تغذیه‌ای، تراکم اسپرم، دمای محلول فعال‌سازی و همچنین ترکیب محلول نمکی نسبت داد. این شرایط می‌تواند به دلیل اثرات نامطلوب غلظت‌های بالای سدیم موجود در سود سوزآور برای تنظیم pH بر تعداد اسپرم‌های متحرک و همچنین مدت زمان اسپرم باشد (۲). علوی و کوسون (۱) اظهار نمودند که مقادیر بالای یون سدیم مانع از تحرک اسپرم ماهیان می‌گردد که با یافته‌های تحقیق حاضر نیز هم‌خوانی داشت، به طوری که با افزایش میزان pH و در نتیجه غلظت یون سدیم ناشی از مصرف بیشتر سود سوزآور از مدت زمان تحرک کاسته شد.

توسعه آبزی‌پروری نیازمند تأمین اسپرم با کیفیت برای انجام فرآیندهایی نظیر به‌نژادی، افزایش راندمان تکثیر و حفظ ذخایر ژنتیکی طبیعی است. به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که تیمارهای حاوی یون‌های دو ظرفیتی دارای تأثیر معنی‌داری بر مدت زمان تحرک اسپرم می‌باشند ($p<0/01$). افزایش زمان تحرک اسپرم از ۳۳/۳۱±۴/۵۰s در محلول بیلارد به عنوان تیمار شاهد در این آزمایش به بیش از سه برابر در تیمار حاوی ۱mmol/L کلسیم (۱۰۵/۰±۶/۷s) نشان‌دهنده اثرات معنی‌دار حضور یون‌های دو ظرفیتی در زمان تکثیر است. تکنیک‌های مختلف نگهداری اسپرم نظیر انجماد موجب افت کیفیت، کاهش مدت زمان تحرک اسپرم و در نهایت کاهش درصد لقاح می‌گردند (۲)، در حالی که تحرک بالای اسپرم یکی از کلیدهای موفقیت در هنگام لقاح است. یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که اصلاح محلول‌های فعال‌سازی اسپرم با کمک هر یک از یون‌های دو ظرفیتی و همچنین تنظیم میزان اسیدیته در هنگام تکثیر می‌تواند به بهبود راندمان تکثیر و افزایش درصد لقاح در کارگاه‌های تکثیر قزل‌آلای رنگین‌کمان منجر گردد، هر چند که ترکیب تمام متغیرهای مطالعاتی در این پژوهش به صورت فاکتوریل و یا یک تیمار واحد می‌تواند نتایج به مراتب دقیق‌تری را ارائه نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از خانم مهندس نرگس عرب به دلیل کمک‌های ایشان در انجام تحلیل‌های آماری و آقای مهندس رضا عصاره برای آماده‌سازی تیمارهای آزمایشی قدردانی می‌نمایند. همچنین تشکر ویژه‌ای از کارکنان مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی کشور وجود دارد که تجهیزات اجرای این پژوهش را فراهم آوردند.

References

1. Alavi, S.M.H., Cosson, J. (2006) Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. Cell Biol Int. 30: 1-14.
2. Billard, R. (1983) Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the rainbow trout, Salmo gairdneri. J Reprod Fertil. 68: 77-84.
3. Billard, R. (1992) Reproduction in rainbow trout: Sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. Aquaculture. 100: 263-298.
4. Billard, R., Cosson, M.P. (1992) Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. J Exp Zool. 261: 122-131.
5. Billard, R., Cosson, J., Crime, L. (1993) Motility of fresh and aged halibut sperm. Aquat Living Resour. 6: 67-75.
6. Baynes, S.W., Scott, A.P., Dawson, A.P. (1981) Rainbow trout, Salmo gairdnerii Richardson, Spermatozoa: cations and pH on motility. J Fish Biol. 19: 259-267.
7. Coetzee, K., Menkveeld, R. (2001) Validation of a new disposable counting chamber. Arch Androlog. 47: 153-156.
8. Cosson, J. (2004) The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. Aquacult Int. 12: 69-85.
9. Cosson, J., Billard, R., Cibert, C., Dreanno, C., Suquet, M. (1999) Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: The Male Gamete: From Basic to Clinical Applications. Gagnon, C. (ed.). (1st ed.) Cache River Press. Vienna, Illinois, USA. p. 161-186.
10. Gallis, J.L., Fedrigo, E., Jatteau, P., Bonpunt, E., Billard, R. (1991) Siberian sturgeon spermatozoa effects of dilution, pH, osmotic pressure, sodium and potassium ions on motility. In: Acipenser. Williot, P. (ed.). (1st ed.) Cemagref, Bordeaux, France. p. 143-151.
11. Kime, D.E., Vanlook, K.J.W., McAllister, B.G., Huyskens, G., Rurangwa, E., Olliver, F. (2001) Computer assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 130: 425-433.
12. Kho, K.H., Tanimoto, S., Inaba, K., Oka, Y., Morisawa, M. (2001) Transmembrane cell signaling

for the initiation of trout sperm motility: roles of ion channels and membrane hyperpolarization for cyclic AMP synthesis. Zoolog Sci. 18: 919-928.

13. Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., Patzner, R.A. (1998) Determination of semen quality of the rainbow trout by sperm motility, seminal plasma parameters and spermatozoal metabolism. Aquaculture. 163: 163-181.
14. Moon, S.H., Kwon, Y.J., Lee, K.J., Chang, J.Y. (2003) Increased plasma 17-hydroxyprogesterone and milt production in response to gonadotropin-releasing hormone agonist in captive male starry flounder, Platichthy sstellatus. Aquaculture. 218: 703-716.
15. Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., Yasuda, K. (1983) Effects of osmolality and potassium onspermatozoan motility of fresh water salmonid fishes. J Exp Biol. 107: 105-113.
16. Rurangwa, E., Kime, D.E., Olllevier, 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. Theriogenology. 67: 848-854.
18. Stoss, J. (1983) Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: Fish Physiology, IX B. Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (eds.). (1st ed.) Academic Press. New York, USA. p. 305-350.
19. Tekin, N., Seçer, S., Akçay, E., Bozkurt, Y., Kayam, S. (2003) The effect of age on spermatological properties in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W. 1792). Turk J Vet Anim Sci. 27: 37-44.
20. Vosoghi, Gh.H., Mostajir, B. (1994) Freshwater Fish. University of Tehran Publications. (4th ed.) Tehran, Iran (in Persian).
21. Yaron, Z. (1995) Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. Aquaculture. 129: 49-73.

Effect of calcium and magnesium ions in the billard salt solution on sperm motility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum 1792)

Talebi Darabi, M.[1], Rajabi Islami, H.[1*], Kamali, A.[1], Bahramian, B.[2]

[1]*Department of Fisheries, College of Agricultural and Natural Resources, Tehran Science and Research Branch, Tehran-Iran*

[2]*Coldwater Fishes Research Center, Tonekabon-Iran*

(Received 6 April 2014, Accepted 25 June 2014)

Abstract:

BACKGROUND: There are different activating salt solutions for sperm induction of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under artificial spawning condition, although some uncertainties are associated with the performance. **OBJECTIVES:** This study was conducted to consider the effects of different concentration of calcium and magnesium ions and change of pH in the Billard salt solution on sperm motility of rainbow trout. **METHODS:** Four-year old broodstocks (n=10) of rainbow trout were randomly selected and adapted to the same experimental condition for two weeks. Experimental solutions were also prepared in triplicate by separately adding 1, 2, and 3 mmol calcium and magnesium to the Billard solution. Another three solutions were also prepared with pH adjustment from 9.0 in the Billard solution to 8.0, 8.5, and 9.5. The broodstocks were then transported to the hatchery and artificially spawned. The collected sperm from all broodstocks were mixed for eliminating the effect of genetically differences between the fishes. Finally, the rainbow trout sperm mobility in the experimental treatments was determined in triplicate and compared by the Billard solution as the control treatment. **RESULTS:** Sperm mobility of rainbow trout in all treatments was significantly more than the control ($p<0.01$). The maximum mobility with 105.0±6.7 s was obtained in the 1 mmol calcium treatment, while the lowest level was found in the Billard treatment (31.33±4.50 s). Between the experimental treatments, calcium had the most effect on the sperm mobility of rainbow trout, although no significant differences was observed on the sperm mobility between 3 mmol calcium and 3 mmol magnesium treatments ($p<0.01$). A downward trend in sperm mobility was found by increasing the pH of activating solutions with the highest and lowest sperm mobility in the pH of 8 and 9.5 treatments, respectively. **CONCLUSIONS:** The findings of the present study demonstrated that modification of activating salt solutions using each doubly charged ions of calcium and magnesium and the pH adjustment could improve the reproduction efficiency and hatching rate in the hatcheries of rainbow trout.

Key words: doubly charged cations, spermatocrit, sperm motility, *Oncorhynchus mykiss*

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Sperm mobility of rainbow trout in activating salt solutions containing different amounts of calcium. Different letters indicate significant differences at $p<0.01$.

Figure 2. Sperm mobility of rainbow trout in activating salt solutions containing different amounts of Magnesium. Different letters indicate significant differences at $p<0.01$.

Figure 3. Sperm mobility of rainbow trout activating salt solutions containing different level of pH. Different letters indicate significant differences at $p<0.01$.

Figure 4. Sperm mobility of rainbow trout in activating salt solutions between all experimental treatments. Different letters indicate significant differences at $p<0.01$.

***Corresponding author's email: rajabi.h@srbiau.ac.ir, Tel: 021-44865474, Fax: 021-44865464**