

[illegible]

: قزل آلاي رنگين کمان، نر تغيير جنسيت يافته، اسپرم، محلول تقويت کننده اسپرم.

یکی از مزایای کنترل جنسیت ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در صنعت آبیاری پروری امکان تولید جمعیت تمام ماده است. قزل‌آلای ماده دیرتر از قزل‌آلای نر به رسیدگی جنسی

انجام شد. در این آزمایش از مخلوط تخمک ۳ مولد ماده (۲- ۴ ساله)، ۶ مولد نر معمولی (برای استحصال اسپرم حاوی کروموزومهای X و Y) و ۳ مولد نر سازی شده برای استحصال اسپرم با کروموزوم X استفاده گردید. مولدان نر مورد استفاده همگی سه ساله بودند.

نرهای تغییر جنسیت یافته بر اساس خصوصیات ظاهری (انحنای فکین و تیرگی رنگ بدن) از میان ماهیانی که در سنین اولیه تیمار هورمونی (آندروژن) روی آنها انجام گرفته بود، انتخاب شدند [۴]. از آنجا که براساس یافته‌های محققان اصولاً در تمام مولدان نر تغییر جنسیت یافته، مجرای اسپرم بر^۲ تشکیل نمی‌شود [۵]، بنابراین در بررسی حاضر نیز از این معیار برای اطمینان از تغییر جنسیت یافته بودن آنها استفاده شد.

نرهای معمولی به طور تصادفی از میان جمعیت مولدان نر رسیده موجود در کارگاه انتخاب شدند و برای اطمینان از رسیدگی جنسی با فشار کمی بر ناحیه شکمی کیفیت اسپرم خارج شده از نظر ظاهری ارزیابی گردید. ماده‌های معمولی نیز به صورت تصادفی از میان جمعیت مولدان ماده موجود در کارگاه انتخاب و برای اطمینان از رسیدگی تخمک‌هایشان، با فشار کمی بر ناحیه شکمی تخمک رسیده سالم خارج شده از منخرج آنها ارزیابی شد.

- -

استحصال تخمک از ماده‌های معمولی و اسپرم از نرهای معمولی، پس از بیهوش کردن مولدان در آب حاوی MS_{۲۲۲}، به شیوه متداول در کارگاههای تکثیر انجام شد. به منظور کاهش آثار استفاده از مولدان ماده مختلف در نتایج آزمایش، تخمکهای استحصالی قبل از لقاح بخوبی با هم مخلوط شدند و برای هر تیمار (۵۰۰ تخمک) از مخلوط تخمکها استفاده گردید [۶].

اولین قدم برای تولید جمعیت تمام ماده، تولید نرهای تغییر جنسیت یافته یا ماده‌های نر سازی شده^۱ است؛ یکی از روشهای آن استفاده از هورمونهای استروئیدی است که به طور معمول تخم یا لاروها را در محلولهای استروئیدی غوطه ور می‌کنند یا به جانور جیره غذایی حاوی این هورمون می‌خورانند [۳]. این کار باعث رشد بیضه فعال در جانور ماده از نظر ژنتیکی می‌شود؛ بیضه اسپرمی تولید می‌کند که به جای کروموزومهای X,Y، فقط حامل کروموزوم X است. نرهای تغییر جنسیت یافته فاقد مجرای اسپرم بر^۲ند و برای استحصال اسپرم باید مورد عمل جراحی قرار گیرند [۱]. شایان ذکر است، اسپرمی که به طور مستقیم از بیضه استحصال می‌شود، تحولاتی مانند باز جذب اسپرماتوزوآ، تنظیم ترکیبات یونی مایع سلومیک و تراوشهای هورمونی را که در نرهای معمولی داخل مجرای اسپرم بر طی می‌شود، نمی‌گذارند.

با توجه به اهمیت نرهای تغییر جنسیت یافته در روند تولید جمعیت‌های تمام ماده در صنعت آبی پروری، شناخت ویژگیهای مواد تناسلی این ماهیان می‌تواند در یافتن راههای بهبود عملیات تکثیر این ماهیان کمک زیادی کند.

هدف از این مطالعه بررسی برخی از خصوصیات اسپرم ماهیان نر تغییر جنسیت یافته قزل آلا^۱ رنگین کمان در مقایسه با نرهای معمولی بود. همچنین تأثیر چگونگی اسپرم‌گیری به روش جراحی و فشار ناحیه شکمی بر کیفیت اسپرم، قابلیت لقاح اسپرم این ماهیان و تأثیر استفاده از مواد تقویت کننده در افزایش مدت زمان تحرک اسپرم این ماهیان مقایسه شد.

-

- -

این آزمایش در اردیبهشت سال ۱۳۸۳ در کارگاه تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر واقع در رودبارک کلاردشت

تناسلی استحصالی پیش از لقاح در یخچال قرار گرفت. در تمام موارد وزن و طول کل مولدان نر اندازه‌گیری و ثبت شد. همچنین برای محاسبه شاخص گنادوسوماتیک^۲ (GSI)، در مواردی که مولدان نر کشته می‌شدند، وزن بیضه‌ها به وسیله ترازوی دیجیتال ثبت گردید.

- - -

برای محاسبه مدت زمان تحرک اسپرم هر مولد نر، یک قطره کوچک اسپرم روی یک لام خشک و تمیز چکانده شد و یک لامل روی آن قرار داده شد. سپس نمونه در زیر میکروسکوپ نوری قرار گرفت و پس از تنظیم میکروسکوپ مدت زمان تحرک اسپرمها یک بار با چکاندن یک قطره آب معمولی و بار دیگر با چکاندن یک قطره محلول تقویت کننده اسپرم $\{ \text{pH}=9, \text{Glycin } 1/0.502\text{g} + \text{Tris } 1/211\text{g} + \text{NaCl } 9\text{g} \}$ ، [۷]، سنجش شد. شایان ذکر اینکه مدت زمان تحرک اسپرم تا زمان متوقف شدن ۹۵-۹۹٪ سلولها در نظر گرفته شد [۸].

برای برداشت اسپرم از ماهیان نر تغییر جنسیت یافته - که فاقد مجرای اسپرم بر بودند - پس از بیهوش کردن مولدان، با ایجاد شکافی از ناحیه مخرج تا زیر باله شکمی به وسیله اسکالپل محوطه شکمی باز و سپس بیضه‌ها به آرامی خارج گردید، سپس برای جلوگیری از مخلوط شدن خون با اسپرم، مویرگهای خونی موجود در اطراف بافت بیضه به وسیله پنس جدا شد و سطح بیضه با پارچه‌ای تمیز خشک گردید. برای جداسازی اسپرم از بافت بیضه، با استفاده از یک الک با چشمه ۲mm بیضه‌ها فشار داده شد و اسپرم رها شده از بیضه در ظرفی زیر الک جمع گردید. ظرف مذکور روی قطعات یخ خرد شده قرار گرفت تا با پایین نگه داشتن دما از هرگونه تغییر در ماهیت اسپرم استحصالی جلوگیری شود (شکل ۱).

از آنجا که اسپرم ماهیهایی نر سازی شده به طور مستقیم از بیضه خارج شده بود، اسپرم تعدادی از نرهای معمولی نیز به طور مستقیم از بیضه استحصال شد. این عمل به منظور مقایسه آنها با اسپرم نرهای معمولی که با فشار شکم از مجرای اسپرم بر^۱ خارج شده بودند، انجام شد. تمام مواد



چگونگی جداسازی اسپرم از بیضه ماهیان تغییر جنسیت یافته

اسپرمتوکریت به وسیله خط کش مخصوص خوانده شد
[۱۰].

GSI

شاخص گنادوسوماتیک GSI از رابطه ۱ محاسبه گردید [۹].
 $100 \times (\text{وزن بدن} / \text{وزن گناد}) = \text{شاخص گنادوسوماتیک}$

تمام لقاحها به روش نیمه خشک انجام شد [۱۱]. برای به حداکثر رساندن میزان لقاح اسپرمها، در تمام تیمارها از محلول تقویت کننده بیلارد استفاده گردید. پس از عملیات لقاح، تخمها با آب کارگاه شسته و پوسته‌های تخم و اسپرمهای اضافی خارج شد. تخمهای لقاح یافته برای طی مراحل جنینی به سینیهای انکوباسیون منتقل گردیدند. تلفات انکوباسیون و تخمهای قارچ زده به طور روزانه شمارش و جدا گردید. پس از گذشت ۱۵۰ درجه روز تخمها شروع به چشم زدن کردند. با توجه به یکسان بودن شرایط محیطی، درصد چشم زدگی تخمها به عنوان معیاری برای سنجش میزان موفقیت لقاح و قابلیت لقاح اسپرم مولدان مدنظر قرار گرفت این مقدار از رابطه ۲ محاسبه شد:

$100 \times (\text{تعداد کل تخمها} / \text{تعداد تخمهای چشم زده}) = \text{درصد چشم زدگی}$
همچنین درصد تفریح تخمهای چشم زده از رابطه ۳ محاسبه گردید:

$100 \times (\text{تعداد کل تخمهای چشم زده} / \text{تعداد تخمهای تفریح شده}) = \text{درصد تفریح تخمهای چشم زده}$

درصد اسپرمهای متحرک در تقسیم بندی ۵ دسته‌ای سنجش تحرک [۹]

بیشتر از ۹۵	۷۵-۹۴	۳۰-۷۴	۱۰-۲۹	کمتر از ۱۰	تمام اسپرمها بی تحرک	

برای محاسبه درصد تحرک اسپرم هر مولد نر، یک قطره کوچک اسپرم روی یک لام خشک و تمیز چکانده و یک لامل روی آن قرار داده شد. سپس نمونه در زیر میکروسکوپ نوری قرار گرفت و پس از تنظیم میکروسکوپ به آرامی یک قطره محلول تقویت کننده اسپرم بیلارد [۷] در کنار لامل چکانده شد تا به زیر آن نفوذ کند و اسپرمها را به تحرک وادارد. درصد اسپرمهای متحرک در هر نمونه به طور تقریبی با چشم سنجش شد و بسته به تعداد اسپرمهای متحرک اعداد حاصل در سیستم ۵-۰ طبقه بندی گردید [۹]. در این سیستم فقط اسپرمهای با حرکت رو به جلو، متحرک و اسپرمهای با حرکت به دور خود یا حرکت پاندولی، غیر متحرک محسوب می شوند (جدول ۱).

برای محاسبه درصد اسپرمتوکریت از لوله‌های میکروهماتوکریت استفاده شد. اسپرم بر اساس خاصیت موینگی از این لوله بالا می‌رود، مگر در مواردی که غلظت آن خیلی بالا باشد، در این حال اسپرم با اندکی مکش به داخل لوله هدایت می‌شود. انتهای لوله‌های میکروهماتوکریت حاوی اسپرم، به وسیله خمیر مخصوص مسدود شد تا اسپرم از آن تخلیه نشود. پس از آن به منظور جداسازی اسپرم از فاز مایع، لوله‌های میکروهماتوکریت به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰g در دستگاه میکروسانتریفوژ افقی، سانتیفوژ گردید؛ سپس درصد

نر تغییر جنسیت یافته، با استفاده از آزمون T غیر جفتی صورت گرفت. بررسی اثر استفاده از محلول تقویت کننده اسپرم در هر یک از تیمارهای مورد مطالعه با استفاده از تجزیه واریانس دو طرفه انجام شد.

نتایج آزمون کولموگراف اسمیرنف نشان داد که داده‌ها با اطمینان ۹۵٪ نرمال بودند ($P > 0.05$). میانگین داده‌های حاصل از بررسی انجام شده در جدول ۲ خلاصه شده است.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار spss۱۲ انجام شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنف سنجیده شد. برای تعیین معنادار بودن اختلاف میان عوامل مورد بررسی در سه تیمار، از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. در صورت مشاهده اختلاف میان داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تعیین معنادار بودن یا نبودن اختلاف موجود در سطح ۹۵٪ استفاده گردید. آزمون T جفتی برای مقایسه معنادار بودن اثر استفاده از محلول تقویت کننده بر مدت زمان تحرک اسپرم در تیمارهای مختلف استفاده شد. مقایسه GSI ها در دو تیمار نر معمولی و

میانگین و انحراف معیار مقادیر عوامل مورد بررسی در تیمارهای مورد مطالعه

						GSI		
()	()	(Liley)	()	()	()		میانگین	()
۹۸/۲۲	۶۰/۲۴	۵	۲۹/۳۳	۲۳	۳۵/۳۳	-		
۰/۸۳	۱۶/۰۱	۰	۵/۱۳	۴/۳۵	۲۱/۳	-	SD	()
۹۷/۹۸	۳۰/۱۸	۳	۲۵/۶۶	۲۱	۷۸	۱/۱۲	میانگین	()
۰/۸۴	۶/۱۴	۰	۱/۱۵	۱	۷	۰/۱۰	SD	()
۹۸/۴۹	۷۱/۱۴	۳/۶۶	۳۸	۲۸/۳۳	۸۴	۳/۰۶	میانگین	()
۳۷/۱۳	۱/۱۷	۰/۵۷	۷/۵۴	۳/۷۸	۱۲/۱۲	۰/۹۳	SD	()

نتایج تجزیه واریانس یک طرفه در تیمارهای مورد بررسی

F	
۳۰/۷۱۴**	درصد اسپرماتوکریت
۳/۷۶۷ ^{ns}	مدت زمان تحرک اسپرم با آب
۴/۳۶۴ ^{ns}	مدت زمان تحرک اسپرم با محلول تقویت کننده اسپرم
۲۸/۰۰۰**	درصد تحرک اسپرم
۲/۴۲۰ ^{ns}	درصد چشم زدگی
۰/۲۱۰ ^{ns}	درصد تفریح

^{ns} بدون اثر معنادار ($P > 0.05$)

** واجد اختلاف معنادار

پایینتر بود ($P < 0/01$). در حالی که اختلاف معناداری بین اسپرماتوکریت نرهای تغییر جنسیت یافته با اسپرم نرهای معمولی که با جراحی خارج شده بود، مشاهده نگردید ($P > 0/05$).

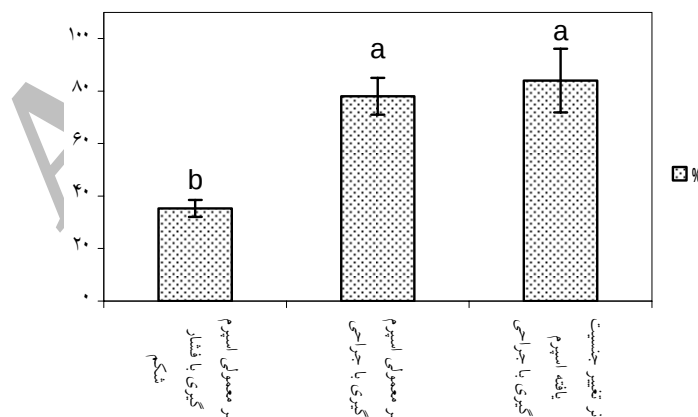
براساس آزمون آنالیز واریانس یک طرفه، مدت زمان تحرک اسپرم فعال شده با آب میان هیچکدام از سه تیمار مورد بررسی تفاوت معناداری نشان نداد ($P > 0/05$). همچنین مدت زمان تحرک اسپرم فعال شده با محلول تقویت کننده بیلارد میان هیچکدام از تیمارها اختلاف معناداری نداشت ($P > 0/05$). آزمون T جفتی نشان داد که محلول تقویت کننده اسپرم در هر سه تیمار مورد بررسی به طور معناداری باعث افزایش مدت زمان تحرک اسپرم می‌گردد ($P < 0/05$). آزمون آنالیز واریانس دو طرفه نیز نشان داد که محلول تقویت کننده اسپرم در سه تیمار مورد بررسی به یک اندازه باعث افزایش مدت زمان تحرک اسپرم می‌شود ($P > 0/05$).

آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد درصد تحرک اسپرم یا تعداد اسپرماتوزوآهای متحرک در سه تیمار مورد بررسی اختلاف معنادار داشتند ($P < 0/01$); بدین ترتیب که در اسپرم نر معمولی - با فشار ناحیه شکمی خارج شد - تعداد اسپرماتوزوآهای متحرک بیشتر از اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته بود و در اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته نیز، این میزان از اسپرم نرهای معمولی - با جراحی خارج گردید - بالاتر بود (نمودار ۳).

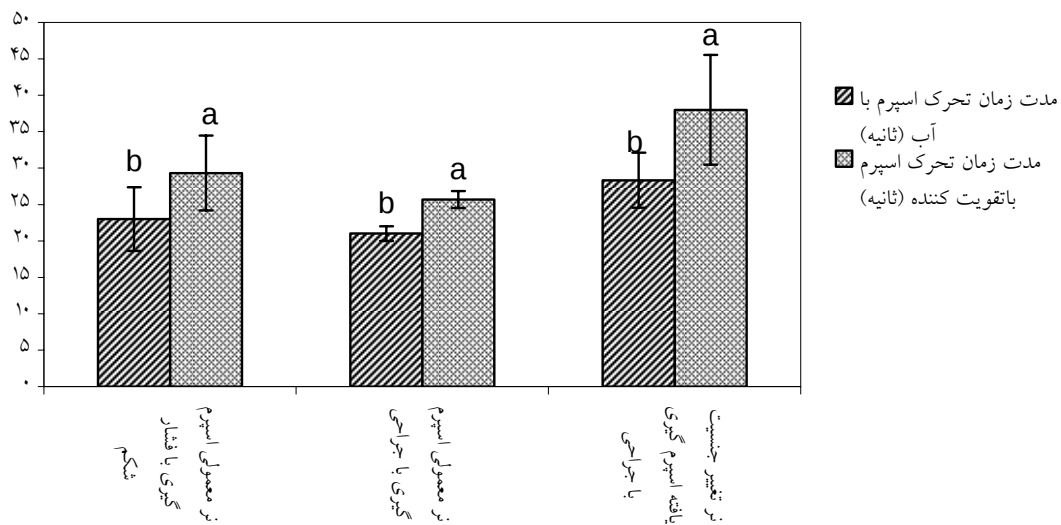
نتایج تجزیه واریانس یک طرفه در تیمارهای مورد بررسی به شرح جدول ۳ می‌باشد.

نتایج آزمون T غیر جفتی نشان دهنده وجود اختلاف معناداری ($P < 0/05$) بین شاخص گنادوسوماتیک ماهیان نر تغییر جنسیت یافته و نرهای معمولی بود و میزان GSI در نرهای تغییر جنسیت یافته بالاتر بود. آزمون همبستگی پیرسون، همبستگی منفی، قوی و معناداری ($P < 0/01$ ، $r = -0/891$) بین میزان اسپرماتوکریت و تعداد اسپرماتوزوآهای متحرک نشان داد؛ یعنی با افزایش میزان اسپرماتوکریت، تعداد اسپرماتوزوآهای متحرک کاهش یافت.

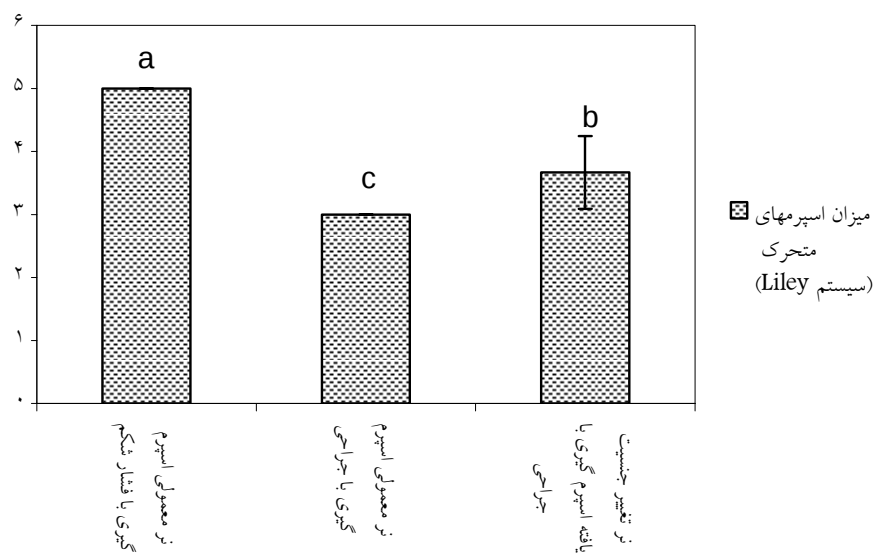
همبستگی مثبت، قوی و معناداری ($P < 0/01$ ، $r = 0/852$) بین مدت زمان تحرک اسپرم با آب و درصد چشم‌زدگی تخمها مشاهده شد. همچنین همبستگی مثبت، قوی و معناداری ($P < 0/01$ ، $r = 0/877$) بین مدت زمان تحرک اسپرم با آب و درصد چشم‌زدگی تخمها و همبستگی مثبت و معناداری ($P < 0/05$ ، $r = 0/766$) بین درصد چشم‌زدگی و درصد تفریخ تخمها مشاهده شد. براساس آزمون آنالیز واریانس یک طرفه، میزان اسپرماتوکریت اسپرم نرهای معمولی (خارج شده با فشار ناحیه شکمی)، در مقایسه با اسپرم نرهای معمولی (خارج شده با جراحی)، به طور معناداری پایینتر بود ($P < 0/01$). میزان اسپرماتوکریت اسپرم نرهای معمولی نیز که با فشار ناحیه شکمی خارج شده بود در مقایسه با اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته به طور معناداری



مقایسه درصد اسپرماتوکریت در تیمارهای مورد بررسی



اثر محلول تقویت کننده بر مدت زمان تحرک اسپرم در تیمارهای مورد بررسی



مقایسه درصد اسپرماتوزوآهای متحرک در تیمارهای مورد بررسی [۹]

در هیچ یک از سه تیمار مورد بررسی، درصد چشم زدگی و تفریخ تخمها، اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند ($P > 0.05$).

-

براساس مطالعات، درصد چشم زدگی تخمها می‌تواند به عنوان معیاری برای سنجش درصد لقاح، قابلیت لقاحی اسپرم و تخمک استفاده شود [۱۲]؛ از آنجا که در مطالعه حاضر از مخلوط تخمک چندین مولد ماده استفاده شد، بنابراین درصد چشم زدگی تخمها می‌تواند نشان دهنده قابلیت لقاحی اسپرم باشد. هیچکدام از خصوصیات اسپرم که در این مطالعه اندازه‌گیری شدند، تفاوت معناداری در قابلیت لقاحی بین مولدان نرهای معمولی و نرهای تغییر جنسیت یافته نشان نمی‌دهند. بیشتر تفاوت‌هایی که در مورد خصوصیات اسپرم نرهای معمولی و نرهای تغییر جنسیت یافته مشاهده شد، می‌تواند به تفاوت بین اسپرم استحصال شده از بیضه و اسپرم موجود در مایع منی که با فشار ناحیه شکمی خارج گردید، نسبت داده شود.

در فصل تولیدمثل، اسپرماتوزوای نرهای معمولی در مجرای اسپرم بر نگهداری می‌شود؛ در حالی که در نرهای تغییر جنسیت یافته به علت نبود این مجرا، اسپرماتوزوآ در داخل بیضه باقی می‌ماند. بنابراین در این مطالعه مشاهده می‌شود میزان اسپرماتوکریت اسپرم نرهای معمولی که با فشار ناحیه شکمی خارج شده بود، در مقایسه با اسپرم نرهای معمولی و نیز اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته که با جراحی خارج شده بودند، به طور معناداری پایینتر بود؛ در حالی که اختلاف معناداری بین اسپرماتوکریت نرهای تغییر جنسیت یافته با اسپرم نرهای معمولی که با جراحی خارج گردیدند، مشاهده نشد.

اسپرماتوکریت معیار آسان و سریعی برای تخمین غلظت اسپرم در مایع منی می‌باشد و با آن رابطه مستقیم دارد [۹]. نتایج یک تحقیق نشان داد که تراکم اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته به طور معناداری از تراکم اسپرم نرهای

معمولی که با فشار ناحیه شکمی خارج شد، بالاتر بود. همچنین، تفاوت معناداری بین تراکم اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته و نرهای معمولی جراحی شده وجود نداشت [۱۳].

در واقع اسپرماتوکریت نشان دهنده نسبت حجم اسپرم به حجم منی می‌باشد. بالا بودن میزان اسپرماتوکریت در اسپرمی که به طور مستقیم از بیضه برداشت می‌شود، در مقایسه با اسپرمی که با فشار ناحیه شکمی خارج می‌شود می‌تواند بدین دلیل باشد که در حالت برداشت مستقیم از بیضه، اسپرم فاقد مایع منی است یا مقدار تراوشات آن بسیار کم است؛ در صورتی که اسپرمی که با فشار ناحیه شکمی خارج می‌شود با تراوشات مایع منی مخلوط است، بنابراین تراکم کمتری نیز دارد.

درصد اسپرماتوزوای متحرک در اسپرم نرهای معمولی که با فشار ناحیه شکمی خارج شد، بیشتر از اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته بود. اسپرم نرهای معمولی که از مجرای اسپرم بر خارج می‌شود با تراوشات مایع منی مخلوط است که حاوی مواد آلی و معدنی مورد نیاز برای زندگی اسپرماتوزوآ می‌باشد بنابراین اسپرماتوزوآ در این مایع بقای طولانیتری دارد و نسبت اسپرماتوزوای متحرک در این ماهیان بیشتر است؛ زیرا اسپرماتوزوای مرده از طریق مجرای اسپرم بر سرعت باز جذب می‌شوند [۱۴]. در حالی که اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته حاوی اسپرماتوزوای زنده همراه با اسپرماتوزوای مرده تجمع یافته در داخل بیضه است که بتدریج باز جذب می‌شوند. علت دیگر می‌تواند این باشد که در نرهای تغییر جنسیت یافته اسپرم داخل بیضه با اسپرمهایی مخلوط است که هنوز به بلوغ ساختاری خود نرسیده‌اند [۱۳].

درصد اسپرماتوزوای متحرک در اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته از اسپرم نرهای معمولی که با جراحی خارج گردید، بالاتر بود. در نرهای معمولی اسپرماتوزوآ پس از تکامل و رسیدن به بلوغ وارد مجرای اسپرم بر می‌شود و در

داخل بیضه مراحل جدید اسپرماتوزن شروع می‌شود. اسپرمی که مستقیم از بیضه نرهای معمولی خارج می‌شود هنوز تکامل نیافته است، بنابراین درصد تحرک پایینی دارد. اما در نرهای تغییر جنسیت یافته اسپرماتوزوای بالغ در داخل بیضه باقی می‌ماند. درصد تحرک اسپرم نرهای معمولی که با فشار شکم خارج شد، همیشه ۱۰۰٪ بود. زیرا اسپرم بالغ به داخل مجرای اسپرم بر هدایت و تمام مراحل تکامل آن در این مجرا طی می‌شود.

جفن^۱ و اوانس^۲ در سال ۲۰۰۰ دریافتند که مدت زمان تحرک اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته به طور معناداری طولانیتر از اسپرم نرهای معمولی بود که با جراحی خارج گردیدند. در مطالعه حاضر مدت زمان تحرک اسپرم فعال شده با آب یا محلول تقویت کننده اسپرم بین هیچ یک از سه تیمار مورد بررسی تفاوت معناداری نشان نداد. اگرچه مدت زمان تحرک اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته از مدت زمان تحرک اسپرم نرهای معمولی که با فشار شکم خارج شده بود به طور متوسط ۹ ثانیه بیشتر بود اما این افزایش معنادار نبود.

استفاده از محلول تقویت کننده اسپرم در هر سه تیمار مورد بررسی به طور معناداری باعث افزایش مدت زمان تحرک اسپرم گردید. بیلارد^۳ و همکاران در سال ۱۹۷۴ دریافتند محلولهای تقویت کننده اسپرم به علت دارا بودن ترکیبات یونی مورد نیاز اسپرم، ایجاد فشار اسمزی و pH مناسب، باعث افزایش مدت زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای معمولی می‌شوند [۷]. مطالعه حاضر نشان می‌دهد محلولهای تقویت کننده اسپرم اثر مشابهی بر مدت زمان تحرک اسپرم قزل‌آلای نر تغییر جنسیت یافته دارند؛ بنابراین می‌توان از این محلولها برای افزایش موفقیت لقاح در ماهیان نر تغییر جنسیت یافته استفاده کرد. این بررسی نشان داد محلولهای تقویت کننده اسپرم در هر سه تیمار مورد بررسی به یک میزان باعث افزایش مدت زمان تحرک اسپرم می‌شود.

در این مطالعه درصد چشم زدگی تخمها که به عنوان معیاری برای سنجش درصد لقاح استفاده شد، بین سه تیمار مورد بررسی اختلاف معناداری نداشت. جفن و اوانس در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که درصد لقاح اسپرم کشیده شده از نر معمولی نسبت به اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته به طور معناداری بالاتر بود [۱۳]. همچنین اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته نسبت به اسپرم نرهای معمولی که با جراحی خارج شده بود، موجب درصد لقاح بالاتری گردید. شاید علت آن، این باشد که در مطالعه حاضر نسبت اسپرم به تخمک برای انجام لقاح بالا بود. موسیا^۴ و مانکیتریک^۵ در سال ۱۹۸۶ نشان دادند در صورت بالاتر بودن نسبت اسپرم به تخمک از حد اپتیمم، حرکت اسپرم، غلظت اسپرم یا اسپرماتوکریت هیچ کدام عامل اصلی برای مشخص کردن رسیدن تخمها به مرحله چشم‌زدگی نمی‌باشند [۶]. بنابراین در تولید جمعیت‌های تمام ماده با استفاده از اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته، اگر از مقدار اسپرم کافی برای لقاح استفاده کنیم، درصد لقاح بالایی را شاهد خواهیم بود.

درصد تفریخ تخمها میان سه تیمار مورد بررسی اختلاف معناداری نداشت. این امر نشان می‌دهد که تخمهای لقاح یافته با اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته از نظر طی مراحل تکامل جنینی مشابه تخمهای لقاح یافته با اسپرم نرهای معمولی است و هیچ تفاوتی ندارند. بنابراین در تولید جمعیت‌های تمام ماده با استفاده از اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته، شاهد کاهش درصد تفریخ تخمها نخواهیم بود. در واقع کیفیت اسپرم این ماهیان از نظر تولید جنینهای سالم و با کیفیت مشابه ماهیان نر معمولی است.

جفن و اوانس در سال ۲۰۰۰ دریافتند که میزان GSI در نرهای معمولی بیشتر از نرهای تغییر جنسیت یافته بود [۱۳]. اگرچه تمام ماهیان بررسی شده هم سن بودند اما اندازه نرهای معمولی کوچکتر از نرهای تغییر جنسیت یافته بود.

4. Moccia
5. Munkittrick

1. Geffen
2. Evans
3. Billard

این نتایج با یافته‌های وِدت و همکاران در سال ۲۰۰۱ در مورد ماهی کفشک هالیبوت (*Hipoglossus hipoglossus*) مشابه است. همچنین در این مطالعه هیچگونه رابطه‌ای بین تراکم اسپرم و قابلیت لقاح مشاهده نشد؛ این امر با نتایج آس^۲ و همکاران در سال ۱۹۹۱ بر ماهی آزاد اقیانوس اطلس مشابه است.

نکته جالب توجه در مطالعه حاضر، این است که با وجود انجام عملیات تکثیر در اواخر دوره تکثیر (اواسط اردیبهشت)، کیفیت و کمیت اسپرم در تمام تیمارها در حد قابل قبول برای لقاح بود.

در جمع‌بندی نهایی می‌توان بیان کرد که اسپرم ماهیان تغییر جنسیت یافته دارای کیفیت بالایی است که با اسپرم استحصالی از ماهیان نر معمولی قابل مقایسه می‌باشد. بنابراین استفاده از این ماهیان برای تولید جمعیت تمام ماده توصیه می‌شود. همچنین استفاده از محلولهای تقویت کننده اسپرم برای افزایش کیفیت اسپرم استحصالی از ماهیان تغییر جنسیت یافته پیشنهاد می‌شود.

-

در پایان لازم است از تمام مسؤولان و کارکنان محترم کارگاه شهید باهنر کلاردشت بخصوص جناب آقای مهندس پاشا زانوسی ریاست محترم مرکز و آقای مهندس گلشاهی مدیر محترم بخش تکثیر که در تمام مراحل اجرای این بررسی با ما همکاری داشتند، نهایت قدردانی را داشته باشیم.

در مطالعه حاضر نشان داده شد که میزان GSI در نرهای تغییر جنسیت یافته بیشتر از نرهای معمولی است؛ البته در اینجا اندازه نرهای معمولی و تغییر جنسیت یافته یکسان بود و تفاوت معناداری نداشت ($P > 0.05$). بنابراین در کل به نظر می‌رسد اندازه بیضه در ماهیان تغییر جنسیت یافته بزرگتر از ماهیان معمولی باشد که از نظر اندازه با آنها یکسانند.

تود^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که ارتباط خطی رگرسیونی معناداری بین غلظت اسپرم و اسپرماتوکریت وجود دارد؛ این رابطه اسپرماتوکریت را به عنوان یک عامل مناسب برای تخمین سریع غلظت اسپرم معرفی می‌کند. بررسی حاضر نشان می‌دهد که با افزایش میزان اسپرماتوکریت، تعداد اسپرماتوزوآهای متحرک کاهش می‌یابد. اسپرماتوکریت در واقع نسبت حجم اسپرم به حجم منی است [۱۳]. با افزایش اسپرماتوکریت، غلظت اسپرم افزایش و مقدار مایع منی و مواد مغذی لازم برای زنده ماندن اسپرم کاهش می‌یابد؛ بنابراین تعداد اسپرمهای متحرک کاهش می‌یابد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که با افزایش مدت زمان تحرک اسپرم، درصد چشم زدگی تخمها که معیاری برای تخمین درصد لقاح است، افزایش می‌یابد. در واقع با افزایش مدت زمان تحرک اسپرم، شانس رسیدن اسپرم به سوراخ میکروپیل افزایش می‌یابد و در نتیجه درصد لقاح و به دنبال آن درصد چشم زدگی افزایش می‌یابد. در این مطالعه رابطه معناداری بین میزان اسپرماتوکریت و مدت زمان تحرک اسپرم مشاهده نگردید؛ همچنین رابطه‌ای بین مدت زمان تحرک اسپرم و درصد اسپرماتوزوآی متحرک مشاهده نشد.

-

- [1] Bye V. J., Lincoln R. F.; "Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout"; *Aquaculture*. 1986; 57: 299-309.
- [2] Panadian T. J., Sheela S. G.; "Hormonal induction of sex reversal in fish"; *Aquaculture*. 1995; 138: 1-22.

- [3] Piferre F.; "Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish"; *Aquaculture*; 2001; 197: 229-281.

[۴] طلا م؛ "بهینه سازی تیمار هورمون ۱۷ آلفا متیل تستوسترون به منظور ایجاد تغییر جنسیت و عقیمی در ماهی قزل آلا؛ پایان نامه کارشناسی ارشد؛ دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران؛ ۱۳۸۰؛ ص. ۲۵۰.

-
- [5] Johnstone R.; "Experience with salmonid sex reversal and triploidisation technologies in the united kingdom"; *Bull; Aquacul. Assoc; Canada*; 1996; (2).
- [6] Moccia R. D., Munkittrick, K. R.; "Relationship between the fertilization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and the motility of spermatozoa"; *Theriogenology*; 1986; 27: 679-688.
- [7] Billard R., Petit J., Jalabert B., Szollosi D.; "Artificial insemination in trout using a sperm diluents. In J. H. S. Blaxter, editor. Early life history of fish. Springer - verlag, Berlin; 1974; pp. 715- 723.
- [8] Billard R.; "Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the rainbow trout"; *J. Repro. Fert.* 1983; 68: 77-84.
- [9] Liley N. R., Tamke P., Tsai R., Hoysak D. J.; "Fertilization dynamics in rainbow trout: Effects of male age, social experience, and sperm concentration and motility on in vitro fertilization"; *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2002; 59: 144-152.
- [10] Vladi T. V., Afzelius B. A., Bronnikov G. E.; "Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories"; *Biology of Reproduction*. 2002; 66: 98-105.
- [11] Arabac M., Dilerb I., Sarb M.; "Induction and synchronization of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified buserelin (GnRHa) and its effects on egg quality"; *Aquaculture*. 2004; 237: 475- 484.
- [12] Aas G. H., Refstie T., Gjerde B.; "Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*"; 1991; 95: 125-132.
- [13] Geffen A. J., Evans J. P.; "Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout"; *Aquaculture*; 2000; 182: 61-72.
- [14] Robles V., Cabrita E., Cunado S., Herraez M. P.; "Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout: Parameters that affect its ability for freezing"; *Aquaculture*; 2003; 224: 203-212.
- [15] Tvedt H. B., Benfey T. J., Martin-Robichaud D. J., Power J.; "The relationship between spermatozoa, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*"; *Aquaculture*; 2001; 194: 191-200.