مجله بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد اول، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۱
http://japu.gau.ac.ir

اثر برخی یون‌ها روی فعالیت اسپرم و کارآیی تکثیر مصنوعی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

حسین خارا[۱]، شهروز برادران‌نویری[۲]، حدیثه دادرس[۳]، مینا رهبر[۳]، محدثه احمدنژاد[۴]، معصومه علی‌نیا[۱] و علی خدادوست[۳]

[۱]استادیار گروه شیلات دانشگاه آزاداسلامی واحد لاهیجان، [۲]انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت، [۳]باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاداسلامی واحد لاهیجان، [۴]پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی، بندرانزلی

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۲۵

چکیده

در این مطالعه، اثر برخی یون‌ها (سدیم، کلسیم، پتاسیم و منیزیم) روی تحرک اسپرم (دوره تحرک و درصد اسپرم‌های متحرک) و ظرفیت لقاح (درصد لقاح، نرخ تفریخ، بازماندگی لارو و طول لارو در دو مرحله جذب کیسه زرده و شروع تغذیه فعال) در ماهی کپور معمولی مورد مطالعه قرار گرفت. جهت بررسی اثر یون‌های مختلف برای هر یون سه غلظت مختلف شامل کلرید سدیم (۱۴۴۹،۱۶۵۶ و ۱۸۶۳ میلی‌گرم در لیتر)، کلرید پتاسیم ۰۳۱۲۰، ۳۴۳۰ و ۳۷۴۴ میلی‌گرم در لیتر)، کلرید منیزیم (۲۸/۸، ۳۱/۶ و ۳۶ میلی‌گرم در لیتر) و کلرید کلسیم (۲۸۰، ۴۰۰ و ۵۲۰ میلی‌گرم در لیتر) تعیین گردید. نتایج نشان داد که افزودن یون منیزیم دارای تأثیر منفی بر تحرک اسپرم و موفقیت لقاح بود. محلول‌های حاوی یون سدیم دارای تأثیر مثبت روی پارامترهای لقاح (درصد لقاح، طول لارو در دو مرحله آغاز تفریخ و شروع تغذیه فعال) بودند. هم‌چنین طول دوره تحرک و درصد اسپرم‌های متحرک در محلول حاوی ۱۶۵۶ میلی‌گرم در لیتر سدیم بیشتر از سایر تیمارها بود. محلول‌های حاوی یون کلسیم روی طول دوره تحرک اسپرم تأثیر منفی گذاشتند، و یون پتاسیم نیز موجب کاهش درصد لقاح گردید. با توجه به نتایج می‌توان اظهار نمود که افزودن یون سدیم دارای تأثیر مثبت بر تحرک اسپرم و میزان موفقیت لقاح بود.

واژه‌های کلیدی: تحرک اسپرم، تکثیر مصنوعی، ظرفیت لقاح، ماهی کپور معمولی، یون‌ها

* مسئول مکاتبه: h_khara1974@yahoo.com

مقدمه

ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) از ماهیان گرمابی است، که توسط انسان به‌طور گسترده به دنیا معرفی شده و سومین گونه معروف جهان محسوب می‌گردد (ولکام، ۱۹۹۲). هم‌چنین این ماهی از گونه‌های مهم پرورشی و زینتی دنیا بوده که دارای ارزش تجاری بالایی است (بالن، ۱۹۹۵) در این بین طی روند تولید تجاری ماهی‌های پرورشی تعیین کیفیت اسپرم و تخمک به‌منظور افزایش درصد لقاح مصنوعی مورد توجه بوده و استفاده از گامت‌هایی با کیفیت مطلوب از مولدین مناسب برای به‌دست آوردن لاروهایی با مقاومت بالا بسیار اهمیت دارد. همان‌طور که یادآوری گردید کیفیت هر دو گامت نر و ماده می‌تواند در موفقیت لقاح و بقاء لاروها مفید واقع گردد (بزکورت و همکاران، ۲۰۰۶). تحرک اسپرم یکی از مهم‌ترین فاکتورها در بررسی کیفیت اسپرم می‌باشد (بیلارد و همکاران، ۱۹۹۵) که روی موفقیت لقاح تأثیر می‌گذارد (علوی و همکاران، ۲۰۰۴) و خود، تحت‌تأثیر عوامل بسیاری هم‌چون pH (علوی و کازون، ۲۰۰۵ آ، ب)، کاتیون‌ها (کازون، ۲۰۰۴؛ علوی و همکاران، ۲۰۰۷)، اسمولاریته (کازون، ۲۰۰۴؛ علوی و همکاران، ۲۰۰۶؛ علوی و همکاران، ۲۰۰۷) و نسبت‌های رقیق‌سازی (علوی و همکاران، ۲۰۰۷) در محلول‌های رقیق‌کننده و محیط‌های آبی است.

برخی مطالعه‌های گذشته مؤید این موضوع بوده‌اند که بررسی تحرک اسپرم به‌ویژه درصد اسپرم‌های متحرک می‌تواند به عنوان یک فاکتور کلیدی جهت ارزیابی موفقیت لقاح (درصد لقاح و نرخ تفریخ) محسوب می‌گردد (لانستنیر و همکاران، ۱۹۹۸؛ منصور و همکاران، ۲۰۰۵). در بیشتر گونه‌ها طول دوره تحرک اسپرم بسیار کم (از ۳۰ ثانیه تا چند دقیقه) می‌باشد. تفاوت میزان طول دوره تحرک در بین گونه‌های مختلف بستگی به ویژگی‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و متابولیکی هر گونه دارد. به‌طوری‌که در سیستم‌های تجاری آبزی‌پروری، افزایش طول دوره تحرک اسپرم به‌وسیله اعمال تغییر در محلول‌های فعال‌کننده یکی از شیوه‌های اساسی در جهت بهبود میزان موفقیت لقاح می‌باشد (علوی و همکاران، ۲۰۰۸ آ).

اهمیت تأثیر یون‌ها روی تحرک و توان باروری اسپرم توسط برخی محققان مورد بررسی قرار گرفته است (استوس، ۱۹۸۳؛ بیلارد و همکاران، ۱۹۹۵؛ کازون، ۲۰۰۴؛ لینهارت و همکاران، ۲۰۰۸). در فرآیند تکثیر مصنوعی، تأثیر یون‌ها روی کارایی تکثیر یکی از پارامترهای بسیار حساس و تأثیرگذار می باشد و یون‌هایی هم‌چون k^+، Ca^{2+}، Na^+ و Mg^{2+} بسیار مؤثر شناخته شده‌اند. به‌طوری‌که تابارس

و همکاران (۲۰۰۷) در تحقیقی بر روی فعالیت اسپرم در ماهی بریکون هنی (*Brycon henni*) بیان کردند یون‌های کلسیم، پتاسیم و سدیم مدت زمان فعالیت آن را کاهش می‌دهند. هم‌چنین پژوهشی روی ماهی باس[1] (هی و جنکینز، ۲۰۰۴) نشان داد که یون منیزیم موجود در اسپرم اثر بازدارندگی روی حرکت اسپرم داشته و کلسیم نیز اثر منفی روی تحرک اسپرم دارد به نحوی که اگر غلظت کلسیم افزوده شود و به ۸۰ mμ برسد اثرات باز دارندگی روی تحرک اسپرم نمایان خواهد شد. تحرک اسپرم در ماهیان توسط علوی و کازون (۲۰۰۶) مرور شد. در این مطالعه بیان شد که بین ترکیبات پلاسمای منی و اسمولالیتی و مدت زمان فعالیت اسپرم ماهیان، ارتباط واضح و روشنی وجود دارد. پارامترهای متفاوتی مثل غلظت یون‌های پتاسیم، سدیم و کلسیم، فشار اسمزی، دما و میزان رقیق‌سازی، می‌تواند تحرک اسپرم را تحت تأثیر قرار دهند. در مجموع می‌توان گفت تاثیر یون‌ها بر اسپرم در گونه‌های مختلف متفاوت است و با توجه به اهمیت آنها بایستی با دیدی عمیق‌تر بدان توجه شود.

در این پژوهش میزان تأثیرگذاری یون‌های سدیم، کلسیم، پتاسیم و منیزیم (به‌عنوان چهار کاتیون مهم و شاخص) بر اسپرم و کارایی تکثیر ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در تیر ماه سال ۱۳۹۰ در مزرعه تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی تعاونی شماره ۱۲ شهرستان رشت انجام شد. به‌منظور انجام این پژوهش در مجموع ۶۰ عدد مولد کپور معمولی (۳۰ عدد نر و ۳۰ عدد ماده) با سن ۲ (میانگین وزن و طول کل ۱۰۴۰±۴۸۳۰ کیلوگرم و ۵/۹۱±۶۸/۷۵ سانتی‌متر) و ۳ ساله (میانگین وزن ۴۸۰±۵۳۸۰ کیلوگرم و طول کل ۱/۲۹±۷۴/۵ سانتی‌متر) انتخاب و تحت تزریق هیپوفیز خشک (به‌ترتیب ۳/۶ و ۱ میلی‌گرم هیپوفیز+ ۰/۳ و ۰/۲۵ سی‌سی سرم فیزیولوژیک در ماده و نر به ازای هر کیلو گرم وزن بدن) قرار گرفتند. ۱۰ ساعت پس از تزریق دوم عمل تخم‌کشی و اسپرم‌گیری از آنها به روش مالشی انجام شد.

تکثیر به روش لقاح خشک و پس از مخلوط کردن تخمک کلیه مولد ماده و اسپرم مجموع مولدین نر (جهت یکسان‌سازی شرایط تکثیر برای ماهیان در گروه‌های سنی مختلف و به حداقل رساندن اثر سن مولدین روی لقاح) انجام شد. قبل از استفاده از اسپرم میزان درصد تحرک و طول دوره تحرک اسپرم اندازه‌گیری شد.

1- Striped bass

تخمک‌های استحصالی از مولدین در سه ظرف جداگانه به‌میزان ۲۵۰ گرم در هر تشتک (با ۳ تکرار) ریخته شد. ۱/۵ میلی لیتر از اسپرم مولدین برای بررسی غلظت‌های یونی موجود در اسپرم و آزمایش‌های تعیین میزان درصد تحرک و طول دوره تحرک اسپرم داخل فلاکس یخ قرار داده و بلافاصله به آزمایشگاه فرستاده شد. اسپرم‌های استحصالی از مولدین ۲ و ۳ ساله پس از یکسان‌سازی شرایط آزمایش با هم مخلوط و به‌میزان ۲/۵ سی‌سی به هر یک از تشتک‌های محتوی تخمک اضافه گردید.

بر اساس نتایج بدست آمده از بررسی میزان یون‌های موجود در مایع منی مولدین (جدول ۲) برای هر یون، ۳ غلظت مختلف تعیین گردید که به هر یک از تیمارهای از پیش تعیین شده، غلظت‌های مختلف یونی بر طبق جدول ۱ اضافه گردید. به این صورت که ابتدا محلول‌های یونی به اسپرم افزوده و سپس لقاح تخمک و اسپرم انجام شد. تخم‌های لقاح یافته به انکوباتور ویس منتقل شدند.

برای بررسی میزان سدیم به روش شعله سنجی و استفاده از فلیم فتومتر Jenwa و به‌منظور ارزیابی میزان یون کلسیم از کیت شرکت Man به روش رنگ‌سنجی (روش متیل تیمول بلو) استفاده شد. همچنین برای محاسبه میزان یون منیزیم از کیت شرکت Pars Azmun به روش رنگ‌سنجی یا فتومتریک (استفاده از ماده رنگی (Xylidyl Blue) برای اندازه‌گیری میزان پتاسیم، سدیم و از دستگاه الکترودآنالایزر مدل Caretium-XI-921 Series تکنولوژی آلمان و به روش رنگ‌سنجی استفاده شد. و بر اساس مقدار یون‌های موجود در اسپرم کپور که در این پژوهش بررسی شد و مطالعات ورما و همکاران (۲۰۰۹) و بوزکورت و همکاران (۲۰۰۸ و ۲۰۰۹) برای هر یک از یون‌های مورد بررسی ۳ غلظت مختلف مشخص گردید.

جدول ۱- تیماربندی یون‌ها در مولدین ماهی کپور معمولی

یون	تیمار ۱ (میلی‌گرم/ لیتر)	تیمار ۲ (میلی‌گرم/ لیتر)	تیمار ۳ (میلی‌گرم/ لیتر)
کلرید منیزیم	۲۸/۸	۳۱/۶	۳۶
کلرید پتاسیم	۳۱۲۰	۳۴۳۰	۳۷۴۴
کلرید سدیم	۱۴۴۹	۱۶۵۶	۱۸۶۳
کلرید کلسیم	۲۸۰	۴۰۰	۵۲۰

برای بررسی تحرک اسپرماتوزوئید، ابتدا به نسبت یک به بیست (۴۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی + ۲ میلی‌لیتر اسپرم) رقیق نموده. و پس از تهیه گسترش در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ به بررسی حرکت اسپرماتوزوئید پرداخته شد (سوکوئت و همکاران، ۱۹۹۲).

۶ ساعت پس از لقاح، به منظور تعیین درصد لقاح در تیمارها حدود ۱۰۰ عدد از تخم‌های داخل هر انکوباتور در زیر لوپ مشاهده و میزان لقاح تخمک‌ها مطابق رابطه ذیل محاسبه و ثبت گردید (برومیج و کومالانتانگا، ۱۹۹۸):

درصد لقاح = (تعداد کل تخمک‌ها / تعداد تخمک‌های لقاح یافته) × ۱۰۰

با تفریخ تخم‌ها (۲۴ ساعت پس از لقاح، در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد) نرخ تفریخ از طریق رابطه ذیل بدست آمد (هانجاوانیت و همکاران، ۲۰۰۸):

نرخ تفریخ = (تعداد تخم‌های لقاح یافته / تعداد لارو) × ۱۰۰

اندازه‌گیری طول اولیه لاروها در ساعات اولیه تفریخ انجام شد. هم‌چنین بررسی طول ثانویه لارو در مرحله جذب کیسه زرده (شروع تغذیه فعال) صورت پذیرفت. درصد بازماندگی لاروها در مرحله آغاز تغذیه فعال حدود ۲۴ ساعت پس ازتفریخ با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد بازماندگی لارو = تعداد لاروهای زنده/تعداد کل لاروهای ذخیره شده) × ۱۰۰

داده‌های به‌دست آمده با توجه به نرمال بودن داده‌ها (آزمون Shapiro-Wilk's)، به‌وسیلهٔ نرم‌افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way Anova) و آزمون دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج

نتایج به‌دست آمده از ارزیابی غلظت یونی در پلاسمای منی مولدین نر ماهی کپور نشان داد که میانگین و انحراف معیار یون منیزیم ۰/۳۸±۴ میلی‌گرم در لیتر، میانگین و انحراف معیار یون پتاسیم ۹/۷۷±۶۵/۲۵ میلی‌گرم در لیتر، میانگین و انحراف معیار یون سدیم ۱۱/۱۵±۲۵/۵ میلی‌گرم در لیتر و میانگین و انحراف معیار یون کلسیم ۰/۷۰±۲/۲۸ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲- ارزیابی غلظت یون‌های منیزیم، پتاسیم، سدیم و کلسیم در مولدین نر ماهی کپور

غلظت یون	میانگین± انحراف معیار (میلی‌گرم در لیتر)	حداقل (میلی‌گرم در لیتر)	حداکثر (میلی‌گرم در لیتر)
منیزیم	۴۸±۴/۵۶	۴۴/۴	۴۵
پتاسیم	۲۵۴۴/۷۵ ± ۳۸۱/۰۳	۲۰۲۸	۲۸۸۶
سدیم	۵۸۶/۵ ±۲۵۶/۴۵	۲۵۳	۸۷۴
کلسیم	۲۲۸ ±۷	۱۸۰	۳۳۰

نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف یون‌های مورد مطالعه بر درصد و طول دوره تحرک اسپرم ماهی کپور در جدول ۳ خلاصه شده است. به‌طوری‌که بیشترین میانگین طول دوره تحرک اسپرم در تیمار شاهد یون‌های منیزیم و کلسیم، غلظت ۳۴۳۰ میلی‌گرم در لیتر یون پتاسیم و غلظت میلی‌گرم در لیتر ۱۶۵۶ یون سدیم و بیشترین میانگین درصد تحرک اسپرم در تیمار شاهد و غلظت ۳۱/۶ میلی‌گرم در لیتر یون منیزیم، تیمار شاهد یون‌های پتاسیم و کلسیم و غلظت ۱۶۵۶ یون میلی‌گرم در لیتر سدیم دیده شد (جدول ۳).

با توجه به آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار آماری از نظر طول دوره تحرک اسپرم بین غلظت‌های مختلف یون منیزیم و تیمار شاهد و بین غلظت‌های مختلف یون سدیم و تیمار شاهد ($P<۰/۰۵$)، وجود داشت. اما با توجه به آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه، اختلاف معنی‌دار آماری از نظر فاکتور بالا بین غلظت‌های مختلف یون پتاسیم و تیمار شاهد ($P>۰/۰۵$) و یون کلسیم و تیمار شاهد ($P>۰/۰۵$) وجود نداشت.

هم‌چنین بر اساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه، اختلاف معنی‌دار آماری از نظر درصد تحرک اسپرم بین غلظت‌های مختلف یون منیزیم و تیمار شاهد ($P>۰/۰۵$)، یون پتاسیم و تیمار شاهد ($P>۰/۰۵$) و یون سدیم و تیمار شاهد ($P>۰/۰۵$) دیده نشد. اما با توجه به آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار آماری از نظر درصد تحرک اسپرم بین غلظت‌های مختلف یون کلسیم و تیمار شاهد ماهی کپور وجود داشت.

جدول ۳- مقایسه میانگین طول دوره و درصد تحرک اسپرم ماهی کپور تحت تاثیر غلظت‌های مختلف یون منیزیم، پتاسیم، سدیم و کلسیم

غلظت یون / پارامتر		طول دوره تحرک اسپرم (ثانیه) حداکثر- حداقل	درصد تحرک اسپرم ماهی حداکثر- حداقل
منیزیم (میلی‌گرم در لیتر)	تیمار شاهد	۴۴ ± ۱ [b]	۷۰ ± ۱۰ [a]
		۴۳-۴۵	۶۰-۸۰
	۲۸/۸	۳۱ ± ۶ [a]	۶۰ ± ۱۰ [a]
		۲۵-۳۷	۵۰-۷۰
	۳۱/۶	۳۴/۵ ± ۲/۵ [a]	۷۰ ± ۱۰ [a]
		۳۲-۳۷	۶۰-۸۰
	۳۶	۳۰/۳۳ ± ۳/۲۲ [a]	۶۵ ± ۵ [a]
		۳۴-۲۸	۶۰-۷۰
پتاسیم (میلی‌گرم در لیتر)	تیمار شاهد	۴۴ ± ۱ [a]	۷۰ ± ۱۰ [a]
		۴۳-۴۵	۶۰-۸۰
	۳۱۲۰	۴۵/۵ ± ۰/۵ [a]	۶۰ ± ۱۰ [a]
		۴۵-۴۶	۵۰-۷۰
	۳۴۳۰	۴۶ ± ۶ [a]	۶۰ ± ۰ [a]
		۴۰-۵۲	۶۰-۶۰
	۳۷۴۴	۳۸/۳۳ ± ۶/۶۶ [a]	۶۰ ± ۱۰ [a]
		۳۴-۴۶	۵۰-۷۰
سدیم (میلی‌گرم در لیتر)	تیمار شاهد	۴۴ ± ۱ [b]	۷۱/۶۷ ± ۷/۶۴ [a]
		۴۳-۴۵	۶۵-۸۰
	۱۴۴۹	۲۹ ± ۲ [a]	۶۵ ± ۵ [a]
		۲۷-۳۱	۶۰-۷۰
	۱۶۵۶	۴۶/۵ ± ۶/۵ [b]	۷۵ ± ۵ [a]
		۴۰-۵۳	۷۰-۸۰
	۱۸۶۳	۳۱ ± ۷ [a]	۶۵ ± ۵ [a]
		۲۴-۳۸	۶۰-۷۰
کلسیم (میلی‌گرم در لیتر)	تیمار شاهد	۴۴ ± ۱ [a]	۷۱/۶۷ ± ۷/۶۴ [b]
		۴۳-۴۵	۶۰-۸۰
	۲۸۰	۳۶/۵ ± ۶/۵ [a]	۶۵ ± ۵ [b]
		۳۰-۴۳	۶۰-۷۰
	۴۰۰	۳۲/۵ ± ۸/۵ [a]	۴۰ ± ۱۰ [a]
		۲۴-۴۱	۳۰-۵۰
	۵۲۰	۳۵/۳۳ ± ۹/۴۵ [a]	۶۵ ± ۵ [b]
		۲۸-۴۶	۶۰-۷۰

*حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین داده‌ها در سطح $P \leq ۰/۰۵$ می‌باشد.

* داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.

نتایج به‌دست آمده از ارزیابی غلظت یونی در روند انکوباسیون ماهی کپور در جدول ۴ خلاصه شده است. به‌طوری‌که بیشترین میانگین درصد لقاح در تیمار شاهد یون پتاسیم (۲/۸۹±۷۸/۳۳ میلی‌گرم در لیتر)، غلظت ۱۸۶۳ یون سدیم (۵±۸۰ میلی‌گرم در لیتر) و غلظت ۲۸۰ میلی‌گرم یون کلسیم (۵±۸۵ میلی‌گرم در لیتر) دیده شد. با توجه به آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار آماری از نظر درصد لقاح بین غلظت‌های مختلف یون پتاسیم و تیمار شاهد (P<۰/۰۵)، بین غلظت‌های مختلف یون سدیم و تیمار شاهد (P<۰/۰۵)، (P<۰/۰۵) و یون کلسیم و تیمار شاهد (P<۰/۰۵) وجود داشت. با توجه به آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه، اختلاف معنی‌دار آماری از نظر درصد لقاح بین غلظت‌های مختلف یون منیزیم و تیمار شاهد وجود نداشت (P>۰/۰۵).

بر طبق نتایج، بیشترین میانگین درصد ظهور لارو در غلظت ۳۷۴۴ یون پتاسیم (۵±۶۵ میلی‌گرم در لیتر)، غلظت ۱۴۹۹ یون سدیم (۵±۷۰ میلی‌گرم در لیتر) و غلظت ۲۸۰ میلی‌گرم یون کلسیم (۲/۸۹±۴۶/۶۷ میلی‌گرم در لیتر) به‌دست آمد. با توجه به آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن، اختلاف معنی‌دار آماری از نظر درصد ظهور لارو بین غلظت‌های مختلف یون پتاسیم و تیمار شاهد (p<۰/۰۵) بین غلظت‌های مختلف یون سدیم و تیمار شاهد (P<۰/۰۵) و یون کلسیم و تیمار شاهد (p<۰/۰۵) وجود دارد. بر اساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه، اختلاف معنی‌دار آماری از نظر درصد ظهور لارو بین غلظت‌های مختلف یون منیزیم و تیمار شاهد مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

بر طبق آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه، اختلاف معنی‌دار آماری از نظر طول لاروهای تازه هچ شده بین غلظت‌های مختلف یون منیزیم و تیمار شاهد (P>۰/۰۵)، یون پتاسیم و تیمار شاهد (P>۰/۰۵) و یون کلسیم تیمار شاهد (P>۰/۰۵) مشاهده نگردید. نتایج نشان داد که بیشترین میانگین طول لاروهای تازه هچ شده مربوط به غلظت ۱۸۶۳ میلی‌گرم در لیتر یون سدیم (۰/۱۴±۲/۸ میلی‌گرم در لیتر) بود. بر اساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن، اختلاف معنی‌دار آماری از نظر فاکتور بالا بین غلظت‌های مختلف یون سدیم و تیمار شاهد مشاهده گردید.

بر اساس نتایج، بیشترین میانگین طول لاروها در آغاز تغذیه فعال مربوط به غلظت ۲۸/۸ میلی‌گرم در لیتر یون منیزیم (۰/۰۶±۴/۹۷ میلی‌گرم در لیتر)، غلظت ۳۷۴۴ میلی‌گرم در لیتر یون پتاسیم (۰/۰۹±۴/۹۵ میلی‌گرم در لیتر) و غلظت ۱۸۶۳ میلی‌گرم در لیتر یون سدیم (۰/۰۶±۴/۹۷ میلی‌گرم در لیتر) بود. بر طبق آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن، اختلاف معنی‌دار آماری از نظر طول

لاروها در مرحله آغاز تغذیه فعال بین غلظت‌های مختلف یون منیزیم و تیمار شاهد، یون پتاسیم و تیمار شاهد (P<۰/۰۵) و یون سدیم و تیمار شاهد (P<۰/۰۵) مشاهده گردید. با توجه به آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه بین غلظت‌های مختلف یون کلسیم و تیمار شاهد ماهیان مورد بررسی از نظر فاکتور طول لاروها در مرحله آغاز تغذیه فعال اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نگردید.

بر اساس نتایج، بیشترین میانگین درصد بازماندگی لارو تا شروع تغذیه فعال مربوط به غلظت ۲۸/۸ میلی‌گرم در لیتر یون منیزیم (۱±۹۱ میلی‌گرم در لیتر)، غلظت ۱۴۴۹ میلی‌گرم در لیتر یون سدیم (۱/۲±۹۰/۸۲ میلی‌گرم در لیتر) و تیمار شاهد یون کلسیم (۵/۱۸±۸۷/۴۱ میلی‌گرم در لیتر) بود. بر طبق آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن، اختلاف معنی‌دار آماری از نظر درصد بازماندگی لارو تا شروع تغذیه فعال بین غلظت‌های مختلف یون منیزیم و تیمار شاهد (P<۰/۰۵)، بین غلظت‌های مختلف یون سدیم و تیمار شاهد (P<۰/۰۵) و بین غلظت‌های مختلف یون کلسیم و تیمار شاهد (P<۰/۰۵) وجود داشت. با توجه به آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه بین غلظت‌های مختلف یون پتاسیم و تیمار شاهد ماهیان مورد بررسی از نظر فاکتور درصد بازماندگی لارو تا شروع تغذیه فعال اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نگردید.

بحث

تعیین مقدار بهینه پارامترهای مؤثر بر فعالیت اسپرم در جهت افزایش کارایی تکثیر مصنوعی حائز اهمیت می‌باشد (علوی و همکاران، ۲۰۰۴). پژوهش‌های متعدد بیانگر تفاوت زیادی در ترکیبات یونی پلاسمای سمینال گونه‌های مختلف می‌باشد. میزان یون پتاسیم و یون سدیم در خانواده کپور ماهیان به‌ترتیب ۱۰۷-۹۴ و ۷۸-۳۹ میلی‌مول در لیتر گزارش شده است (بیلارد و همکاران، ۱۹۹۵؛ کروگر و همکاران، ۱۹۸۴).

برای مثال غلظت پتاسیم در *Tinca tinca* ۱/۹۳ (لینهارت و همکاران، ۲۰۰۳)، در *Barbus barbus* ۹۸ (علوی و همکاران، ۲۰۰۸ آ)، در *Barbus sharpeyi* ۲۸/۸ میلی‌مول در لیتر (علوی و همکاران، ۲۰۱۰) و در این مطالعه در مورد کپور ۲۵۴۴/۷۵ میلی‌گرم در لیتر (۶۵/۲۵ میلی‌مول در لیتر) بوده است. این تفاوت در غلظت‌های پتاسیم پلاسمای سمینال بیانگر ویژگی‌های خاص هر گونه می‌باشد (سیرزکو و همکاران، ۲۰۰۰).

جدول ۴- مقایسه میانگین روند انکوباسیون ماهی کپور تحت‌تأثیر غلظت‌های مختلف یون منیزیم، پتاسیم، سدیم و کلسیم

غلظت یون	پارامتر	درصد لقاح حداکثر- حداقل	درصد ظهور لارو حداکثر- حداقل	طول لاروهای تازه هچ شده (میلی متر) حداکثر- حداقل	طول لاروها در آغاز تغذیه فعال (میلی‌متر) حداکثر- حداقل	درصد بازماندگی لارو تا شروع تغذیه فعال حداکثر- حداقل
منیزیم (میلی‌گرم در لیتر)	تیمار شاهد	۷۸/۳۳ ± ۲/۸۹ [a]	۳۵ ± ۵ [a]	۲/۵۸ ± ۰/۲۹ [a]	۴/۳۳ ± ۰/۲۹ [a]	۸۰ ± ۱۰ [a]
		۷۵-۸۰	۳۰-۴۰	۲/۲۴-۲/۷۵	۴-۴/۵	۷۰-۹۰
	۲۸/۸	۷۵ ± ۵ [a]	۴۵ ± ۵ [a]	۲/۶۷ ± ۰/۱۹ [a]	۴/۹۷ ± ۰/۰۶ [b]	۹۱ ± ۱ [b]
		۷۰-۸۰	۴۰-۵۰	۲/۵-۲/۸۸	۴/۹-۵	۹۰-۹۲
	۳۱/۶	۸۵ ± ۵ [a]	۴۱/۶۷ ± ۲/۸۹ [=a]	۲/۵۷ ± ۰/۰۸ [a]	۴/۸۷ ± ۰/۲۲ [b]	۹۰/۸۴ ± ۱/۰۴ [b]
		۸۰-۹۰	۴۰-۴۵	۲/۴۸-۲/۶۵	۴/۶۲-۵	۹۱-۹۳
	۳۶	۸۰ ± ۵ [a]	۴۱/۶۷ ± ۲/۸۹ [a]	۲/۸۸ ± ۰/۱۷ [a]	۴/۹ ± ۰/۰۶ [b]	۸۹/۷۵ ± ۱/۶۴ [b]
		۷۵-۸۵	۴۰-۴۵	۲/۶۸-۳	۴/۸۳-۴/۹۵	۸۸-۹۱
پتاسیم (میلی‌گرم در لیتر)	تیمار شاهد	۷۸/۳۳ ± ۲/۸۹ [b]	۳۵ ± ۵ [a]	۲/۵۸ ± ۰/۲۹ [a]	۴/۳۳ ± ۰/۲۹ [a]	۸۷/۴۱ ± ۵/۱۸ [a]
		۷۵-۸۰	۳۰-۴۰	۲/۲۴-۲/۷۵	۴-۴/۵	۸/۱۵-۹۱/۳
	۳۱۲۰	۶۵ ± ۵ [a]	۴۳/۳۳ ±۲/۸۹ [ab]	۲/۸ ± ۰/۱ [a]	۴/۳۳ ± ۰/۱۳ [a]	۹۰/۳۳ ± ۱/۱۶ [a]
		۶۰-۷۰	۴۰-۴۵	۲/۷-۲/۹	۴/۲-۴/۴۵	۸۹-۹۱
	۳۴۳۰	۷۰ ± ۵ [ab]	۴۵ ± ۵ [b]	۲/۷۵ ± ۰/۱۴ [a]	۴/۳ ± ۰/۱ [a]	۸۹/۶۷ ± ۰/۲۹ [a]
		۶۵-۷۵	۴۰-۵۰	۲/۵۹-۲/۸۵	۴/۱۹-۴/۳۸	۸۹/۵-۹۰
	۳۷۴۴	۷۰ ± ۵ [ab]	۶۵ ± ۵ [c]	۲/۷۷ ± ۰/۱۶ [a]	۴/۹۵ ± ۰/۰۹ [b]	۸۲/۹۴ ± ۲/۵۷ [a]
		۶۵-۷۵	۶۰-۷۰	۲/۶۵-۲/۹۵	۴/۸۵-۵	۸۰/۲-۴/۸۵
سدیم (میلی‌گرم در لیتر)	تیمار شاهد	۷۸/۳۳±۲/۸۹ [bc]	۳۵ ± ۵ [bc]	۲/۵۸ ± ۰/۲۹ [b]	۴/۳۳ ± ۰/۲۹ [bc]	۸۷/۴۱ ± ۵/۱۸ [b]
		۷۵-۸۰	۳۰-۴۰	۲/۲۴-۲/۷۵	۴-۴/۵	۹۱-۸۲
	۱۴۴۹	۷۰ ± ۵ [b]	۷۰ ± ۵ [c]	۲/۵۲±۰/۱۹ [ab]	۴/۴۷ ± ۰/۲۲ [b]	۹۰/۸۲ ± ۱/۲ [b]
		۶۵-۷۵	۶۵-۷۵	۲/۳۵-۲/۷۲	۴/۲۳-۴/۶۷	۹۰-۹۲
	۱۶۵۶	۶۰ ± ۵ [a]	۴۵ ± ۵ [a]	۲/۱۴ ± ۰/۱۶ [a]	۴/۷۹ ± ۰/۱۵ [a]	۸۱/۶۷ ± ۱/۵۳ [a]
		۵۵-۶۵	۴۰-۵۰	۲-۲/۳۱	۴/۶۳-۴/۹۲	۸۰-۸۳
	۱۸۶۳	۸۰ ± ۵ [c]	۴۳/۳۳ ± ۲/۸۹ [b]	۲/۸ ± ۰/۱۴ [b]	۴/۹۷ ± ۰/۰۶ [c]	۸۰/۴ ± ۰/۴۹ [a]
		۷۵-۸۵	۴۰-۴۵	۲/۶۵-۲/۹۳	۴/۹-۵	۸۰-۸۱
کلسیم (میلی‌گرم در لیتر)	تیمار شاهد	۷۸/۳۳ ± ۲/۸۹ [c]	۳۵ ± ۵ [a]	۲/۵۸ ± ۰/۲۹ [a]	۴/۳۳ ± ۰/۲۹ [a]	۸۷/۴۱ ± ۵/۱۸ [b]
		۷۵-۸۰	۳۰-۴۰	۲/۲۴-۲/۷۵	۴-۴/۵	۸۲-۹۱
	۲۸۰	۸۵ ± ۵ [c]	۴۶/۶۷ ± ۲/۸۹ [b]	۲/۵۴ ± ۰/۱۷ [a]	۴/۶۶ ± ۰/۲۳ [a]	۸۱/۶۳ ± ۰/۳۸ [a]
		۸۰-۹۰	۴۵-۵۰	۲/۳۵-۲/۶۸	۴/۴۴-۴/۸۹	۸۱-۸۲
	۴۰۰	۷۰ ± ۵ [b]	۳۱/۶۷ ± ۲/۸۹ [a]	۲/۷۸ ± ۰/۱۷ [a]	۳/۹۳ ± ۰/۰۸ [a]	۸۴/۶۷ ± ۱/۵۳ [b]
		۶۵-۷۵	۳۰-۳۵	۲/۶-۲/۹۲	۳/۸۵-۴	۸۳-۸۶
	۵۲۰	۶۱/۶۷ ± ۲/۸۹ [a]	۳۱/۶۷ ± ۲/۸۹ [a]	۲/۸۷ ± ۰/۱۵ [a]	۴/۴۳ ± ۰/۴۴ [a]	۸۰ ± ۰ [a]
		۶۰-۶۵	۳۰-۳۵	۲/۷-۲/۹۷	۴-۴/۸۸	۸۰-۸۰

*حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین داده‌ها در سطح $P \leq ۰/۰۵$ می‌باشد.

* داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.

یون پتاسیم عامل اصلی در عدم تحرک اسپرماتوزوای آزاد ماهیان و ماهیان خاویاری است به‌طوری‌که طبق گزارش بیلارد و کازون (۱۹۸۶) وجود ۴۰-۱۰ میلی‌مول یون پتاسیم، مانع تحرک اسپرم قزل‌آلا می‌شود که این مقدار به‌طور معمول در مایع اسپرمی وجود دارد.

با بررسی اثر یون پتاسیم در این پژوهش مشخص گردید که درصد و طول دوره تحرک اسپرم، طول لاروها در زمان شروع تغذیه فعال و میزان بازماندگی لاروها در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. اما میزان نرخ تفریخ و طول لارو در مرحله آغاز تغذیه فعال در تیمار ۳ (۳۷۴۴ میلی‌گرم بر لیتر) و درصد لقاح در تیمار شاهد دارای بیشترین مقدار بود و اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده گردید. بر پایه نتایج این پژوهش و در راستای تأیید برخی مطالعات که روی گونه‌های دیگر هم‌چون *Puntius javanicus* (موریتا و همکاران، ۲۰۰۶)، *Barbus barbus* (علوی و همکاران، ۲۰۰۹) و *Barbus sharpeyi* (علوی و همکاران، ۲۰۱۰) صورت گرفته پتاسیم به‌عنوان یک عامل کلیدی در فعالسازی اسپرم معرفی شده است.

طبق بررسی‌های انجام شده روی تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) بهترین و بیشترین تحرک از نظر درصد اسپرم‌های متحرک (٪۳۳/۴±۷۲/۵) و مدت زمان تحرک اسپرم (۹/۱۱±۱۹۹ ثانیه)، بعد از رقیق‌سازی اسپرم در ۰/۲ میکرومول از کلرید پتاسیم مشاهده شد. حرکت اسپرم فقط بعد از فعال‌سازی توسط ۱ میکرومول یا بیشتر کلرید پتاسیم متوقف گردید. هم‌چنین هیچ تفاوتی در مدت تحرک اسپرم در بین نمونه‌های تحت بررسی تا ۲ میکرو مول یا بیشتر مشاهده نشد (علوی و همکاران، ۲۰۰۴).

در این راستا در آزمایشی که روی ماهی بریکون هنی (*Brycon henni*) انجام شد، بالاترین میزان تحرک (۷۵ درصد) در محلول‌های حاوی پتاسیم به‌دست آمد (تابارس و همکاران، ۲۰۰۴). هم‌چنین تأثیر پتاسیم در میزان تحرک اسپرم ماهی سیم دریائی نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بیان‌گر آن بود که تحرک اسپرم در پلاسمای منی ماهی سیم دریایی توسط غلظت یون پتاسیم و اسمولالیتی کنترل نمی‌شود (هی و جنکینز، ۲۰۰۴) نتایج این پژوهش نشان داد که میزان درصد لقاح تحت‌تأثیر یون پتاسیم کاهش یافت. این در حالی است که میزان ظهور و طول لارو در مرحله آغاز تغذیه فعال در بالاترین غلظت (۳۷۴۴ میلی‌گرم بر لیتر) دارای مقدار بیشینه بودند که شاید به‌دلیل نقش بیشتر تخمک بعد از انجام لقاح و فرآیند انکوباسیون باشد. چرا که بر اساس برخی مطالعات، کیفیت تخمک نقش مهمی در میزان موفقیت لقاح دارد (بروکس و همکاران، ۱۹۹۷) و خود تخمک تحت‌تأثیر عوامل

مختلف محیطی، بیولوژیکی (بروکس و همکاران، ۱۹۹۷؛ جورسویک و همکاران، ۱۹۹۰) و ژنتیکی (سو و همکاران، ۱۹۹۷؛ گال و گراس، ۱۹۷۸). پتاسیم یک یون کلیدی در کنترل تحرک اسپرم در آزاد ماهیان و تاس‌ماهیان در ترکیب با فشار اسمزی است. در مقایسه با مایع منی زمانی‌که فشار اسمزی، بالا (در کپور ماهیان) یا پایین (در ماهیان دریایی) رود، از تحرک اسپرم جلوگیری می‌کند (علوی و کازون، ۲۰۰۶).

بنابراین افزایش غلظت یون پتاسیم عاملی باز دارنده در جنبش و تحرک اسپرم محسوب شد. و این در حالی است که در این مطالعه میزان درصد تحرک اسپرم با افزودن پتاسیم کاهش یافت.

نقش سدیم نیز به‌عنوان یک یون مؤثر بر تحرک و مدت زمان تحرک غیرقابل انکار است. بر اساس تحقیقات انجام شده روی تاس‌ماهی ایرانی، حداکثر درصد اسپرماتوزوآی قادر به حرکت و کل مدت زمان تحرک اسپرم در محلول‌های حاوی ۲۵ میکرومول کلرید سدیم مشاهده شد، که ۵ ثانیه بعد از آغاز تحرک اسپرم بود. بیشترین مدت زمان تحرک آن برابر (۸۵±۴/۵۶s) ثانیه بوده و بیشترین درصد اسپرماتوزوآی متحرک برابر (۳۵/۰±۲۰۷/۷۵ درصد) بود. از طرفی حداقل درصد اسپرماتوزوآی متحرک و کم‌ترین مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآ در محلول ۱۲۵ میکرو مولی کلرید سدیم بدست آمد، که به‌ترتیب عبارت بودند از: (۱۰/۱۱±۳۶/۲۵ ثانیه) و (۵/۹۶±۴۳/۷۵ درصد). درصد اسپرماتوزوآی متحرک به‌طور قابل‌توجهی در بین ۲۵ و ۱۰۰ میکرومول کلرید سدیم تفاوت معنی‌داری را نشان داد. به هر حال درصد اسپرماتوزوآی متحرک با سرعت بعد از ۳۰ و ۴۵ ثانیه بعد از فعال‌سازی در محلول حاوی ۲۵ و ۵۰ میلی‌مول کلرید سدیم افزایش یافت، به‌طوری‌که ۳ دقیقه بعد از فعال‌سازی، غلظت کلرید سدیم را در محدوده صفر تا ۲۰ میکرو مول به محیط اضافه شد که دارای تأثیرات مثبت بود، اما در بیش از ۵۰ میکرو مول اثر باز دارنده داشت (علوی و همکاران، ۲۰۰۴). در این پژوهش درصد تحرک اسپرم در غلظت ۱۶۵۶ میلی بر لیتر گرم سدیم بیشتر از سایر غلظت‌ها بود و طول دوره تحرک اسپرم نیز در این غلظت با تفاوت اندکی بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۳). در این راستا در آزمایشی روی ماهی بریکون هنی، سدیم به‌طور خالص و یا به‌صورت ترکیبی، تأثیری بر روی تحرک اسپرم نداشت، اما مدت زمان تحرک را کاهش داد. به‌طوری‌که با افزایش میزان سدیم، مدت زمان تحرک از ۶۳ ثانیه به ۴۴ ثانیه کاهش یافت (تابارس و همکاران، ۲۰۰۷). ارزیابی تیمارهای یون سدیم بیان‌گر این بود که تیمار سوم (۱۸۶۳ میلی‌گرم بر لیتر) دارای بیشترین میزان درصد لقاح و طول لارو

در دو مرحله آغاز تفریخ و شروع تغذیه تغذیه فعال بود. هم‌چنین طول دوره و درصد تحرک اسپرم در تیمار دوم (۱۶۵۶ میلی‌گرم بر لیتر) دارای مقدار بیشینه بود. پارامترهای درصد لقاح و طول لاروهای به‌دست آمده در دو مرحله آغاز تغذیه فعال در این پژوهش دارای بیشترین مقدار در غلظت ۱۸۶۳ میلی‌گرم بر لیتر سدیم بودند که بیان‌گر تأثیر مثبت سدیم بوده است.

یکی دیگر از یون‌های مؤثر بر میزان تحرک و مدت زمان تحرک اسپرم، یون منیزیم است. اطلاعات محدودی در مورد تأثیر منیزیم بر تحرک اسپرم ماهیان اسخوانی وجود دارد (علوی و همکاران، ۲۰۰۴). در این پژوهش مشخص گردید که میزان طول دوره تحرک اسپرم در تیمار شاهد بیشتر از سایر تیمارها بود. با توجه به نتایج افزودن یون منیزیم تأثیر منفی بر درصد و طول دوره تحرک اسپرم داشته است.

در تیمار اول (۲۸/۸ میلی‌گرم بر لیتر) بیشترین میزان نرخ تفریخ، طول لارو در مرحله آغاز تغذیه فعال و بازماندگی لارو در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد. این در حالی است که در تاس‌ماهی ایرانی (*A. persicus*) بیشترین میزان تحرک و مدت زمان تحرک اسپرم در محلول حاوی ۱۰ میکرومول سولفات منیزیم مشاهده شد. به هر حال هیچ تفاوتی در پارامترهای تحرک اسپرم در بین نمونه‌های تحت بررسی در ۵ میکرومول یا بیشتر سولفات منیزیم دیده نشد. اما غلظت بیش از ۱۰ میکرومول سولفات منیزیم اثر منفی روی پارامترهای تحرک در اسپرماتوزوآی تاس‌ماهی ایرانی داشت. یعنی در غلظت کمتر از ۱۰ میکرومول هیچ‌تأثیری بر درصد و مدت زمان تحرک اسپرم نداشته ولی افزایش آن یک عامل منفی و محدودکننده درصد تحرک و مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآ در تاس‌ماهی ایرانی شناخته شد (علوی و همکاران، ۲۰۰۴).

طبق بررسی‌های انجام شده بر روی ماهی بریکون هنی (*Brycon henni*) طولانی‌ترین دوره تحرک اسپرم هنگامی به‌دست آمد که رقیق‌سازی در محلول حاوی منیزیم به همراه سدیم انجام شد. به‌طوری‌که محلول آزمایش شده باعث نوسان درصد تحرک بین ۴۲ و ۷۵ درصد گردید (تابارس و همکاران، ۲۰۰۷). اثر یون منیزیم بر میزان و مدت زمان تحرک اسپرم در ماهی سیم دریایی نیز توسط هی و همکاران (۲۰۰۴) مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه به‌دست آمده بیان‌گر این امر بود که تحرک اسپرم در محلول حاوی یون منیزیم می‌تواند آغاز شود، در مقابل، تحرک اسپرم توسط محلول‌های شامل بیشتر از ۱۰ میلی‌مول منیزیم، باز داشته شد (هی و همکاران، ۲۰۰۴). هم‌چنین در مورد ماهی *Larimichthys polyactis* میزان تحرک اسپرم در محلول شامل ۰/۲ مول کلرید منیزیم بعد از فعال‌سازی اسپرم افزایش یافت اما در غلظت بالای ۰/۲ مول‌کلرید منیزیم طول دوره تحرک

اسپرم کاهش چشم‌گیری یافت (لیم و همکاران، ۲۰۱۱). در این مطالعه افزودن منیزیم با غلظت ۲۸/۸ میلی‌گرم بر لیتر دارای تأثیر مثبت بر درصد ظهور لارو، طول لارو در مرحله آغاز تغذیه فعال و بازماندگی آنها بود. اما با افزایش غلظت منیزیم در مورد کلیه پارامترهای یاد شده اثر منفی مشاهده شد.

پژوهش‌های گذشته مؤید نقش کلیدی کلسیم در فعال‌سازی اسپرم می‌باشد (علوی و همکاران، ۲۰۰۴، علوی و کازون، ۲۰۰۶). نتایج افزودن یون کلسیم در سه تیمار مختلف نشان داد که تیمار شاهد دارای بیشترین میزان درصد تحرک اسپرم و نیز بازماندگی لارو بود.

هم‌چنین تیمار اول (۲۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) دارای میزان بیشینه درصد لقاح، نرخ تفریخ و طول لارو در مرحله آغاز تغذیه فعال بود اما میزان طول لارو در مرحله شروع تفریخ در تیمار سوم (۵۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) بیشتر از سایرین بود.

تحرک اسپرم می‌تواند در محلول‌های شامل کلسیم فعال شود. در مقابل، تحرک اسپرم توسط محلول‌های حاوی کمتر از ۱۰ میلی‌مول باز داشته می‌شود و اسپرم نمی‌تواند دوباره توسط محلول‌های رقیق‌کننده و بدون کلسیم فعال شود. به‌عبارتی اگر تحرک اسپرم ابتدا در محلول رقیق‌کننده بدون کلسیم فعال شود با افزودن بیشتر از ۸۰ میلی‌مول فعالیت آن متوقف می‌شود. بنابراین افزایش غلظت کلسیم فعالیت و تحرک اسپرم را بازمی‌دارد و این روند در اسپرماتوزوآی ماهی سیم دریایی بررسی و ثابت شده است (هی و همکاران، ۲۰۰۴).

در راستای تأیید این موضوع در این پژوهش، درصد و طول دوره تحرک اسپرم با افزودن یون کلسیم کاهش یافت و پارامترهای یاد شده در تیمار شاهد دارای بیشترین میزان بودند. هم‌چنین ثابت شده که کلسیم موجود در پلاسمای منی ماهی بریکون هنی هیچ تأثیری بر میزان تحرک اسپرماتوزوآی آن ندارد ولی مدت زمان تحرک را کاهش می‌دهد یعنی هر چه غلظت کلسیم افزایش یابد مدت زمان فعال‌سازی اسپرم کاهش می‌یابد (تابارس و همکاران، ۲۰۰۷). از سوی دیگر بررسی‌های انجام شده بر روی تاس‌ماهی ایرانی نشان می‌دهد که بیشترین میزان تحرک اسپرم و مدت زمان تحرک آن در محلول‌های حاوی ۳ میکرومول سولفات کلسیم دیده می‌شود. همچنین با افزایش غلظت کلسیم به‌میزان بیش از ۳ میکرو مول تأثیرات منفی بر روی تحرک اسپرم بیشتر خواهد شد (علوی و همکاران، ۲۰۰۴). حساسیت زیستی اسپرم در مقابل کلسیم توسط توس و همکاران (۱۹۹۷) و کازون و همکاران (۱۹۹۹) گزارش شده است. بر همین اساس مقدار کلسیم بیش از ۱۰ میکرومول تأثیرات منفی بر روی تحرک

اسپرم خواهد داشت. به‌طوری‌که با افزایش سولفات کلسیم تا ۵ میکرومول یا بیشتر یک کاهش شدید در درصد اسپرماتوزوآهای متحرک دیده می‌شود.

مطالعات بر روی الگوی حرکتی اسپرماتوزوآی ماهیان آب شیرین نشان داده است که یون کلسیم در چگونگی بروز رفتار اسپرم بعد از آغاز تحرک نقش تنظیمی ایفاء می‌نماید به‌طوری‌که با افزایش غلظت خارج سلولی کلسیم، مدت زمان تحرک اسپرم افزایش می‌یابد (بیلارد و کازون، ۱۹۹۲). این در حالی است که غلظت بالای کلسیم در محلول‌های تقویت‌کننده ممکن است باعث تغییر یا تخریب پروتئین ATP-ase، که پروتئین تنظیم‌کننده فعالیت انرژی‌خواه کانال‌های یونی سدیم- پتاسیم در سطح غشاء سیتوپلاسمی اسپرم می‌باشد، گردد و ممکن است که به کاهش لقاح تخم‌ها منجر شود (علوی، ۱۳۸۱). اثر تجمعی یون‌ها منجر شده است که محققان نشان دهند، امکان کنترل تحرک با تغییر پتانسیل غشاء، به‌وسیله ترکیب تأثیر چندین یون وجود دارد (کازن و هکاران، ۱۹۹۹).

با استناد به این نتایج می‌توان گفت که یون سدیم دارای تأثیر مثبت بر تحرک اسپرم بوده و افزودن یون‌های کلسیم، منیزیم و پتاسیم در سه غلظت تعیین شده به‌عنوان عامل بازدارنده تحرک عمل کردند.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان و کلیه کارکنان مزرعه تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی تعاونی شماره ۱۲ واقع در روستای آقا سیدشریف شهرستان رشت نهایت تشکر و سپاس را داریم.

منابع

1.Alavi, S.M.H., Karami, M., Mojazi amiri, B. and Akhoundzadeh, M. 2004. Spermatozoa motlity in the Persian sturgeon:effects of pH, diluton rate, ions and osmolality. Reproduction. 128: 819-828.
2.Alavi, S.M.H. and Cosson, J. 2005a. Sperm motility and fertilizing ability in the Persian sturgeon Acipenser persicus. Aquaculture Research. 36: 841-850.
3.Alavi, S.M.H. and Cosson, J. 2005b. Sperm motility in fishes: I. Effects of temperature and pH. Cell Biology International. 29: 101-110.
4.Alavi, S.M.H. and Cosson, J. 2006. Sperm motility in fishes: (II) Effects of ions and osmolality. Cell Biology International. 30: 1-14.
5.Alavi, S.M.H., Rodina, M., Policar, T., Kozak, P., Psenicka, M. and Linhart, O. 2007. Semen of (*Perca fluviatilis*): Sperm volume and density, seminal plasma

indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. Theriogenology. 68: 276-283.
6.Alavi, S.M.H., Linhart, O., Coward, K. and Rodina, M. 2008a. Fish spermatology: implication for aquaculture management. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward, K. and Rafiee, R (eds). Fish spermatology, Oxford, Alpha Science Internationally Ltd, 39761.
7.Alavi, S.M.H., Psenicka, M., Rodina, M., Policar, T. and Linhart, O. 2008b. Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in (*Barbus barbus*) (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season. Aquaculture Research. 21: 75-80.
8.Alavi, S.M.H., Rodina, M., Policar, T. and Linhart, O. 2009. Relationships between semen characteristics and body size in (*Barbus barbus*) and effects of ions and osmolality on sperm motility. Comperative Biochemistry and Physiology. 153: 430-437.
9.Alavi, S.M.H., Jorfi, E., Hatef, A. and Mortezavi, S.A.S. 2010. Sperm motility and seminal plasma characteristics in *Barbus sharpeyi*. Aquaculture Research. 41: e688-e694.
10.Balon, E.K. 1995. Origin and domestication of the wild carp, Cyprinus carpio: from Roman gourmets to the swimming flowers. Aquaculture. 129: 3-48.
11.Billard, R. and Cosson, M.P. 1986. Sperm motility in rainbow trout, Parasalmo gairdneri: Effects of pH and temperature In: Breton, B. and Zohar, Y (eds). Reproduction in fish basic and applied aspects in endocrinology and genetics. INRA, Paris. Pp: 161-167.
12. Billard, R. and Cosson, M.P. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in fresh water fish. Journal of Experimental Zoology. 261: 122-131.
13.Billard, R., Cosson, J., Perchec, G. and Linhart, O. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture. 129: 95-112.
14.Bromage, N.R. and Cumaranataunga, R. 1988. Egg production in the rainbow trout in recent advances in Aquaculture. In: Muir, J.F and R.J., Robert (eds). 39: 63-139.
15.Bozkurt, Y., Secer, S. and Bejcan, S. 2006. Relationship Between Spermatozoa Motility, Egg Size, Fecundity and Fertilization Success in (*Salmo trutta*) abanticus . Tarim Bilimleri Dergisi. 12(4): 345-348.
16.Brooks, S., Tyler, C.R. and Sumpter, J.P. 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 7: 387-416.
17.Bozkurt, Y., Ogretmen, F., Ercin, U. and Yildiz, U., 2008. Seminal plasma composition and its relationship with physical spermatological parameters of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) semen: with emphasis on sperm motility. Aquaculture Research. 39: 1666-1672.

18. Bozkurt, Y., Ogretmen, F., Secer, F.S. and Ercin, U. 2009. Effects of Seminal Plasma Composition on Sperm Motility in Mirror Carp (*Cyprinus carpio*). The Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgeh. 61(4): 307-314.
19. Ciereszko, A., Glogowski, J. and Dabrowski, K. 2000. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: Tiersch, T.R. and Mazik, P.M (ed), Cryopreservation of Aquatic Species, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. Pp: 20-48.
20. Cosson, J., Billard, R., Gibert, C., Dreanno, C. and Suquet, M. 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: Gagnon, C (ed), the male gamete, From basic to clinical application, Cache Rive Press. Pp: 161-186.
21. Cosson, J. 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. Aquaculture International. 12: 69-85.
22. Gall, G.A.E. and Gross, S.J. 1978. A genetics analysis of the performance of three rainbow trout broodstocks. Aquaculture. 15: 113-127.
23. Hanjavanit, C., Kitancharoen, N. and Rakmanee, C. 2008. Experimental Infection of Aquatic Fungi on Eggs of African Catfish (*Clarias gariepinus Burch*). KKU Science. 36: 36-43.
24. He, S. and Jenkins, K. 2004. Activation of sperm motility in striped bass via a CAMP-independent pathway. Theriogenology. 61: 1487-1498.
25. Kjorsvik, E., Mangor-Jensen, A. and Homefjord, I. 1990. Egg quality in fishes. Advances in Marine Biology. 26: 71-113.
26. Kruger, J.C., Smith, G.L., VanVuren, J.H.J. and Ferreira, J.T. 1984. Some chemical and physical characteristics of the semen of (*Cyprinus carpio*) and (*Oreochromis mossambicus*). Journal of Fish Biology. 24: 263-72.
27. Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. and Patzner, R.A. 1998. Evaluation of semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by sperm motility, seminal plasma parameters and spermatozoa metabolism. Aquaculture. 163: 163-181.
28. Lim, H.K., Min, B.H., Park, M.S., Son, M.H., Lee, J.U. and Chang, Y.J. 2011. Effects of varying dilutions, pH, temperature and cations on spermatozoa motility in fish (*Larimichthys polyactis*). Environmental Biology. 32: 271-276.
29. Linhart, O., Alavi, S.M.H., Rodina, M., Gela, D. and Cosson, J. 2008. Comparison of sperm velocity, motility and fertilizing ability between firstly and secondly activated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Applied Ichthyology. 24: 386-396.
30. Mansour, N., Ramoun, A. and Lahnsteiner, F. 2005. Quality of testicular semen of African catfish (*Clarias gariepinus*) and its relationship with fertilization and hatching success. Aquaculture Research. 36: 1422-1428.
31. Morita, M., Okuno, M., Susilo, E.S., Setyo, B.P., Martarini, D., Harnadi, L. and Takemura, A. 2006. Changes in sperm motility in response to osmolality/Ca^{2+} in three Indonesian fresh water teleosts: Goby (*Oxyeleotris marmorata*), Java

carp (*Puntius javanicus*), and catfish (*Clarias batrachus*). Comprative Biochemistry and Physiology. 143: 361-367.
32. Stoss, J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. and Donaldson, E.M (ed), Fish Physiology. Academic Press, NewYork, NY, USA. Pp: 305-350.
33. Su, G.S., Liljedahl, L. and Gall, G.A.E. 1997. Genetic and environmental variation of female reproductive traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 154: 115-124.
34. Suquet, M., Omnes, M.H., Normant, Y. and Fauvel, C., 1992. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scprthalmus maximus*). Aquaculture. 101: 177-185.
35. Tabares, J., Ruiz, T., Arboleda, L. and Olivera, M. 2007. Effect of some ions on sperm activation in (*brycon henna*). Acta Biológica Colombiana. 12n.1, 87-98.
36. Toth, G.P., Ciereszko, A., Christ, S.A. and Dobrowski, K. 1997. Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*): activation and inhibition conditions. Aquaculture. 154: 337-348.
37. Verma, D.K., Routray, P., Dash, C., Dasgupta, S. and Jena, J.K. 2009. Physical and Biochemical Characteristics of Semen and Ultrastructure of Spermatozoa in Six Carp Species. Turkish Journal of Fishery and Aquatice Science. 9: 67-76.
38. Welcomme, R.L. 1992. The conservation and environmental management of fisheries in inland and coastal water. Netherlands Journal of Zoology. 42:176-189.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Utilization and Cultivation of Aquatics, Vol. 1(3), 2012
http://japu.gau.ac.ir

Effect of some ions on sperm activity and artificial propagation performance in *Cyprinus carpio*

***H. Khara[1], Sh. Baradaran Noveyri[2], H. Dadras[3], M. Rahbar[3], M. Ahmadnezhad[4], M. Alinia[1] and A. Khodadoust[3]**

[1]Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Islamic Azad University, Lahijan branch, [2]International Sturgeon Research Institute, Rasht, [3]Young Researcher Club, Islamic Azad University, Lahijan Branch, [4]Inland Water Aquaculture Research Center, Bandar Anzali

Received:2012-3-3 ; Accepted: 2012-5-14

Abstract

In this study, saline solutions containing cations (Na^+, K^+, Ca^{+2}, Mg^{+2}) were used to investigate the effect of ions on motility characteristics of spermatozoa (sperm movement duration and percentage of motile spermatozoa) and fertilizing capacity of sperm (fertilization rate, hatching rate, larvae length during hatching, larvae length during active feeding and survival rate) in *Cyprinus carpio*. To evaluate the effects of ions on sperm motility, Na^+ (NaCl) (1449, 1656 and 1863 mg/L), K^+ (KCl) (3120, 3430 and 3744 mg/L), Mg^{2+} ($MgCl_2$) (28.8, 31.6 and 36 mg/L) and Ca^{2+} ($CaCl_2$) (280, 400 and 520 mg/L) were used. The results showed that solution containing Mg^{2+} had negative influence on sperm motility and fertilization success. Solution containing Na^+ had positive effect on fertilization parameters (fertilization rate, larvae length during yolk sac absorption and active feeding). Also, duration of sperm motility and percentage of motile spermatozoa were high in solution containing 1656 mg/L than other treatments. Solution containing Ca^{2+} and k^+ had negative influence on sperm movement duration and fertilization rate respectively. With regard to our results can be concluded that Na ion is influencing factors involved in fertilizing capacity of common carp spermatozoa.

Keywords: Artificial propagation; *Cyprinus carpio*; Fertilization capacity; Sperm motility; Ions

* Corresponding Author; Email: h_khara1974@yahoo.com