

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080026.1400.15.2.3.5>

اثر کاتیون ها بر روی تحرک و ظرفیت لقاح اسپرم ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) محدثه احمدنژاد^{۱*}، شهروز برادران نویری^۲

^۱ پژوهشکده آبی پروری داخلی، بندرانزلی، ایران^۲ انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۸/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۱۲

چکیده

اثر برخی یون ها (سدیم، کلسیم، پتاسیم و منیزیم) روی تحرک اسپرم (دوره تحرک و درصد اسپرم های متحرک) و ظرفیت لقاح (درصد لقاح، نرخ تفریح، بازماندگی لارو و طول لارو در دو مرحله جذب کیسه زرده و شروع تغذیه فعال) در ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) مورد مطالعه قرار گرفت. برای بررسی اثر یون های مختلف برای هر یون سه غلظت مختلف شامل کلرید سدیم (۲۲۰۸، ۲۳۹۳ و ۲۵۷۶ میلی گرم در لیتر)، کلرید پتاسیم (۱۲۰۰، ۱۴۰۰ و ۱۸۰۰ میلی گرم در لیتر)، کلرید منیزیم (۱۳۲، ۲۲۸ و ۳۲۴ میلی گرم در لیتر) و کلرید کلسیم (۱۰۰۰، ۱۲۰۰ و ۱۴۰۰ میلی گرم در لیتر) تعیین گردید. نتایج نشان داد که بیشترین میزان طول دوره تحرک اسپرم و درصد لقاح به ترتیب در تیمارهای شامل ۲۳۹۳ و ۲۵۷۶ میلی گرم در لیتر کلرید سدیم به دست آمد ($P < 0/05$). محلول های شامل غلظت های مختلف کلرید پتاسیم موجب کاهش درصد اسپرم های متحرک، درصد لقاح و نرخ تفریح گردید ($P < 0/05$). میزان تحرک اسپرم در تیمار شامل کلرید منیزیم کاهش یافت و بلافاصله بعد از فعال سازی توسط محلول شامل ۱۲۰۰ میلی گرم در لیتر کلرید کلسیم متوقف گردید. در تیمار شامل؛ ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر کلرید کلسیم بیشترین میزان نرخ تفریح (80 ± 5 میلی گرم در لیتر) و بازماندگی لارو ($92/29 \pm 0/91$ میلی گرم در لیتر) مشاهده گردید. با توجه به نتایج می توان بیان نمود که افزودن یون سدیم و کلسیم دارای تأثیر مثبت بر میزان موفقیت لقاح ماهی کپور علفخوار بود.

واژه های کلیدی: اسپرم، کپور علفخوار، لقاح، تفریح، کاتیون

مقدمه

ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) از جمله گونه های غیربومی و وارداتی به ایران برای توسعه فعالیت های شیلاتی و آبی پروری می باشد که به علت رشد سریع، رژیم غذایی گیاه خواری، فرارگیری در سطوح پایین زنجیره غذایی و گوشت لذیذ از طرفداران زیادی در بین پرورش دهندگان برخوردار است (عبدلی، ۱۳۷۸). از آنجایی که کنترل فرایند تولیدمثل مستلزم استفاده از

اسپرم با کیفیت مناسب می باشد (Billard و Jensen، ۱۹۹۶) برای بهبود تکنیک های لقاح مصنوعی کارآمد، داشتن دانش بنیادی در مورد بیولوژی اسپرم ضروری می باشد (Alavi و Cosson، ۲۰۰۲). در این بین، عامل تحرک به عنوان یک شاخص برای ارزیابی کیفیت اسپرم در ماهیان استفاده می شود (Billard و همکاران، ۱۹۹۵؛ Lahnsteiner و همکاران، ۱۹۹۸). در بیش تر گونه ها اسپرم در مجرای اسپرم بر و پلاسمای سمینال بدون تحرک می باشد (Morisawa، ۱۹۸۵). عوامل بازدارنده تحرک اسپرم قبل از رهاسازی

* مسئول مکاتبه: m_ahmadnezhad@yahoo.com

هم‌چون غلظت یون‌ها، فشار اسمزی، دما و میزان رقیق‌سازی بر تحرک اسپرم به‌عنوان یک عوامل مهم در حصول لقاح موفق مؤثر بوده، برای افزایش کارایی تکثیر ترکیب محلول‌های رقیق‌کننده واجد اهمیت می‌باشد و محتویات محلول‌های لقاح باید، براساس ویژگی‌های خاص هر گونه تعیین گردد (Billard و همکاران، ۱۹۹۵؛ Alavi و Cosson، ۲۰۰۵). در راستای اهمیت ویژه ترکیبات یونی و تأثیرپذیری تحرک اسپرم به‌عنوان یک شاخص برجسته کیفیت از یون‌های پتاسیم، سدیم، کلسیم و منیزیم در مطالعه حاضر اقدام به بررسی تأثیر کاتیون‌های نام‌برده بر کارایی تکثیر ماهی کپور علفخوار گردید.

مواد و روش‌ها

برای انجام مطالعه حاضر که در تیرماه ۱۳۹۰ در مزرعه تکثیر و پرورش ماهیان در استان گیلان انجام شد، از ۳۰ عدد مولد نر و ۳۰ عدد مولد ماده کپور علفخوار (با دامنه وزنی ۲/۵-۱/۵ کیلوگرم و طول کل ۹۱-۸۳ سانتی‌متر برای ماده‌ها و دامنه وزنی ۲-۱/۵ کیلوگرم و طول کل ۹۷-۹۱ سانتی‌متر برای نرها) استفاده گردید. انتخاب مولدین نر و ماده از استخرهای خاکی نگهداری مولدین به‌صورت تصادفی انجام شد. تزریق هورمون پس از تعیین سن و وزن مولدین صورت پذیرفت. مولدین ماده طی دو مرحله با استفاده از ترکیب ۲ میلی‌گرم هیپوفیز، ۰/۴ میکروگرم هورمون LHRH-A2 و ۰/۲ سی‌سی سرم فیزیولوژیک به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن و مولدین نر با استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم هیپوفیز، ۰/۴ میکروگرم هورمون LHRH-A2 به همراه ۰/۲۵ سی‌سی سرم فیزیولوژیک به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن هم‌زمان با تزریق دوم (حدود ۸ ساعت بعد از تزریق اول) مولدین ماده مورد تزریق قرار گرفتند. حدود ۱۲-۱۰ ساعت بعد از تزریق دوم عمل تخم‌کشی و اسپرم‌گیری مولدین به روش مالشی انجام شد. پس از عمل تخم‌کشی و

در گونه‌های مختلف متفاوت است. به‌عنوان مثال؛ در کپورماهیان میزان بالای اسمولاریته پلاسمای سمینال موجب تحرک نداشتن اسپرم می‌گردد (Morisawa و همکاران، ۱۹۸۳؛ Marian و همکاران، ۱۹۹۳؛ Krasznai و همکاران، ۲۰۰۰؛ Linhart و همکاران، ۲۰۰۳). با توجه به تأثیرپذیری تحرک اسپرم از یون‌ها در فرآیند تکثیر مصنوعی، تأثیر یون‌ها بر روی کارایی تکثیر یکی از پارامترهای بسیار حساس و دارای اهمیت می‌باشد؛ به‌طوری‌که در ماهیان آب شیرین وجود شوک هیپواسموتیکی برای القا تحرک ضروری است (Cosson و همکاران، ۱۹۹۹). ویژگی‌های شیمیایی محیط‌های القاکننده تحرک تأثیر به‌سزایی بر طول دوره تحرک و توانایی لقاح اسپرم دارند (Cosson و همکاران، ۱۹۹۹؛ Alavi و Cosson، ۲۰۰۲). عواملی هم‌چون pH، حرارت و اسمولاریته نیز بر روی تحرک اسپرم تأثیرگذار بوده (Morisawa و همکاران، ۱۹۸۳؛ Alavi و Cosson، ۲۰۰۵؛ Alavi و Cosson، ۲۰۰۶) و تعادل یونی پلاسمای سمینال در توان تحرک (Ohta و همکاران، ۲۰۰۱) و میزان تحرک کافی اسپرم پس از رهاسازی به آب نقش مهمی دارد (Morisawa و Suzuki، ۱۹۸۰؛ Cosson و همکاران، ۱۹۹۹). مطالعه‌ای که بر روی فعالیت اسپرم در ماهی بریکون هنی (*Brycon henni*) انجام شد بیان داشت که یون‌های کلسیم، پتاسیم و سدیم مدت زمان فعالیت آن را کاهش می‌دهند (Tabares و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین در مورد ماهی باس (*Striped bass*) (He و Jenkins، ۲۰۰۴) اثبات گردید که یون منیزیم موجود در اسپرم موجب بازدارندگی تحرک شده و کلسیم نیز تأثیر منفی بر روی تحرک اسپرم داشته است، به‌طوری‌که با افزایش غلظت کلسیم به ۸۰ میکرومتر اثرات بازدارندگی بر روی تحرک اسپرم نمایان شد. از آنجایی‌که بین ترکیبات پلاسما منی، اسمولاریته و مدت زمان فعالیت اسپرم ماهیان، ارتباط قابل درکی وجود دارد (Alavi و Cosson، ۲۰۰۶) و عواملی

ایران به روش رنگ‌سنجی (روش متیل تیمول بلو) استفاده شد. همچنین برای محاسبه میزان یون منیزیم از کیت شرکت پارس آزمون- ایران به روش رنگ‌سنجی یا فتومتریک استفاده از ماده رنگی (Xylidyl Blue) برای اندازه‌گیری میزان پتاسیم و سدیم از دستگاه الکتروود آنالایزر با مدل Caretium-XI-921 Series ساخت آلمان و به روش رنگ‌سنجی استفاده شد. براساس مقدار یون‌های موجود در اسپرم که در این پژوهش به‌دست آمد و مطالعات Verma و همکاران (۲۰۰۹)، Bozkurt و همکاران (۲۰۰۸) و Bozkurt و همکاران (۲۰۰۹) برای هر یک از یون‌های مورد بررسی ۳ غلظت مختلف مشخص گردید. برای آماده‌سازی محلول‌های فعال‌کننده اسپرم ابتدا مواد شیمیایی به دقت توزین شده و به‌طور جداگانه با یک لیتر آب مقطر کاملاً حل گردیدند. به دنبال آن pH به‌وسیله محلول تریس (شامل HCl و NaOH) و با استفاده از دستگاه pH متر مدل W.T.W در pH مورد نظر (۸/۵±۰/۲) تنظیم شد.

اسپرم‌گیری از مولدین، کل تخمک‌های استحصالی از هر مولد پس از توزین در سه تشتک جداگانه به‌میزان ۲۵۰ گرم در هر کدام (با ۳ تکرار) ریخته شد. برای یکسان‌سازی شرایط تکثیر برای ماهیان در گروه‌های سنی مختلف و به حداقل رساندن اثر سن مولدین بر روی لقاح تخمک‌های استحصالی از همه مولدین با هم مخلوط گردید. قبل از استفاده از اسپرم، ۱/۵ میلی‌لیتر از اسپرم مولدین برای بررسی غلظت‌های یونی موجود در اسپرم، تعیین میزان درصد تحرک اسپرم و طول دوره تحرک به آزمایشگاه انتقال یافت. سپس اسپرم‌های استحصالی از هر گروه سنی به‌منظور یکسان‌سازی شرایط آزمایش با هم مخلوط و پس از تقسیم به تعداد تیمارها، غلظت‌های مختلف یونی طبق جدول ۱ به اسپرم اضافه گردید. عمل لقاح به روش خشک (Dry Fertilization) صورت گرفت.

برای بررسی میزان سدیم به روش شعله‌سنجی و استفاده از دستگاه فلیم‌فتومتری Jenwa- انگلیس و به‌منظور ارزیابی میزان یون کلسیم از کیت شرکت من-

جدول ۱- تیمار بندی یون‌ها در مولدین ماهی کپور علفخوار.

یون	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
کلرید منیزیم (میلی‌گرم در لیتر)	۱۳۲	۲۲۸	۳۲۴
کلرید پتاسیم (میلی‌گرم در لیتر)	۱۲۰۰	۱۴۰۰	۱۸۰۰
کلرید سدیم (میلی‌گرم در لیتر)	۲۲۰۸	۲۳۹۳	۲۵۷۶
کلرید کلسیم (میلی‌گرم در لیتر)	۱۰۰۰	۱۲۰۰	۱۴۰۰

از عمل لقاح، بر طبق رابطه زیر محاسبه گردید (Brommage و Cumalantunga, ۱۹۹۸):

$$\text{درصد لقاح} = \frac{\text{تعداد تخمک‌های لقاح‌یافته}}{\text{تعداد کل تخمک‌ها}} \times 100$$

۲۴ ساعت پس از لقاح، نرخ تفریح از طریق رابطه زیر به‌دست آمد (Hanjavanit و همکاران, ۲۰۰۸):

$$\text{نرخ تفریح} = \frac{\text{تعداد تخمک‌های لقاح‌یافته}}{\text{تعداد لارو}} \times 100$$

بررسی درصد تحرک اسپرماتوزوئید به‌صورت چشمی انجام شد. به این منظور، رقیق‌سازی اسپرم به نسبت ۱:۲۰۰۰ انجام گردید و پس از تهیه گسترش در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ بررسی شد. مدت زمان تحرک اسپرم نیز به‌صورت چشمی با استفاده از زمان‌سنج تا لحظه‌ای که تقریباً تمام اسپرماتوزوآها (۱۰۰ درصد) از حرکت بایستند، اندازه‌گیری شد (Alavi و Cosson, ۲۰۰۶). تعیین درصد لقاح، ۶ ساعت پس

۵ درصد و با نرم افزار SPSS16 انجام شد.

نتایج

نتایج به دست آمده از ارزیابی غلظت یونی در پلاسمای منی مولدین نر ماهی کپور علفخوار در جدول ۲ نشان داده شده است. بیشترین غلظت مربوط به یون پتاسیم $۱۷۵۵ \pm ۳۹۶/۶۳$ میلی گرم در لیتر و کمترین غلظت متعلق به یون کلسیم $۳۳ \pm ۲۴/۷$ میلی گرم در لیتر بوده است.

در ساعات اولیه تفریح اقدام به اندازه گیری طول اولیه لاروها شد و همچنین طول ثانویه لارو در مرحله جذب کیسه زرده (شروع تغذیه فعال) بررسی گردید. درصد بازماندگی لاروها در مرحله آغاز تغذیه فعال حدود ۲۴ ساعت پس از تفریح با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد بازماندگی لارو} = \frac{\text{تعداد لاروهای زنده}}{\text{تعداد کل لاروهای ذخیره شده}} \times ۱۰۰$$

تجزیه و تحلیل داده ها با توجه به نرمال بودن آن ها، با استفاده از آزمون های آنالیز واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین ها با آزمون دانکن در سطح اطمینان

جدول ۲- ارزیابی غلظت یون های منیزیم، پتاسیم، سدیم و کلسیم در مولدین نر ماهی کپور علفخوار.

غلظت یون	انحراف معیار \pm میانگین	حداقل	حداکثر
منیزیم (میلی گرم در لیتر)	$۶۸/۴ \pm ۴۱/۲۸$	۳۷/۲	۱۳۹/۲
پتاسیم (میلی گرم در لیتر)	$۱۷۵۵ \pm ۳۹۶/۶۳$	۱۰۹۲	۲۱۴۵
سدیم (میلی گرم در لیتر)	$۸۷۴ \pm ۹۰/۶۲$	۷۸۲	۹۸۹
کلسیم (میلی گرم در لیتر)	$۳۳ \pm ۲۴/۷$	۱۱	۶۸

منیزیم، پتاسیم و سدیم با تیمار شاهد وجود داشت ($P < ۰/۰۵$).

بیشترین میانگین درصد لقاح در تیمار شاهد غلظت ۲۲۸ میلی گرم یون منیزیم، در تیمار شاهد یون های پتاسیم و کلسیم و در غلظت ۲۵۷۶ میلی گرم یون سدیم به دست آمد (جدول ۴). اختلاف معنی داری از نظر درصد لقاح بین غلظت های مختلف یون منیزیم، پتاسیم، سدیم و کلسیم با تیمار شاهد وجود داشت ($P < ۰/۰۵$) و بیشترین میانگین درصد ظهور لارو در غلظت ۱۳۲ میلی گرم یون منیزیم، در تیمار شاهد یون پتاسیم، در غلظت ۲۲۰۸ میلی گرم یون سدیم و در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم یون کلسیم (۸۰ ± ۵ میلی گرم در لیتر) دیده شد.

بر طبق نتایج، بیشترین میانگین طول دوره تحرک اسپرم در تیمار شاهد یون های منیزیم و کلسیم، غلظت ۱۸۰۰ میلی گرم یون پتاسیم و غلظت ۲۳۹۳ میلی گرم یون سدیم و بیشترین میانگین درصد تحرک اسپرم در تیمار شاهد یون های منیزیم، پتاسیم، سدیم و کلسیم دیده شد (جدول ۳).

بر طبق نتایج اختلاف معنی دار در ماهی کپور علفخوار از نظر طول دوره تحرک اسپرم بین غلظت های مختلف یون منیزیم و یون پتاسیم با تیمار شاهد وجود نداشت ($P > ۰/۰۵$). اختلاف معنی دار از نظر طول دوره تحرک اسپرم بین غلظت های مختلف یون سدیم و یون کلسیم با تیمار شاهد وجود داشت ($P < ۰/۰۵$). اختلاف معنی دار از نظر درصد تحرک اسپرم بین غلظت های مختلف یون کلسیم،

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

غلظت یون	پارامتر	طول دوره تحرک اسپرم حداکثر- حداقل	درصد تحرک اسپرم ماهی حداکثر- حداقل
منیزیم (میلی‌گرم در لیتر)	تیمار شاهد	26 ± 9^a (۱۷-۳۵)	85 ± 5^c (۸۰-۹۰)
	۱۳۲ میلی‌گرم	$25/5 \pm 0/5^a$ (۲۵-۲۶)	75 ± 5^{ab} (۷۰-۸۰)
	۲۲۸ میلی‌گرم	20 ± 2^a (۱۸-۲۲)	80 ± 0^{bc} (۸۰-۸۰)
پتاسیم (میلی‌گرم در لیتر)	تیمار شاهد	26 ± 9^a (۱۷-۳۵)	85 ± 5^c (۸۰-۹۰)
	۱۲۰۰ میلی‌گرم	22 ± 2^a (۲۰-۲۴)	65 ± 5^{ab} (۶۰-۷۰)
	۱۴۰۰ میلی‌گرم	19 ± 3^a (۱۶-۲۲)	70 ± 0^b (۷۰-۷۰)
سدیم (میلی‌گرم در لیتر)	تیمار شاهد	26 ± 9^a (۱۷-۳۵)	85 ± 5^b (۸۰-۹۰)
	۲۲۰۸ میلی‌گرم	20 ± 3^a (۱۷-۲۳)	65 ± 5^a (۶۰-۷۰)
	۲۳۹۳ میلی‌گرم	44 ± 0^b (۴۴-۴۴)	60 ± 0^a (۶۰-۶۰)
کلسیم (میلی‌گرم در لیتر)	تیمار شاهد	26 ± 9^b (۱۷-۳۵)	80 ± 0^b (۸۰-۸۰)
	۱۰۰۰ میلی‌گرم	$19/5 \pm 2/5^b$ (۱۷-۲۲)	50 ± 0^b (۵۰-۵۰)
	۱۲۰۰ میلی‌گرم	0 ± 0^a (۰)	0 ± 0^a (۰)
	۱۴۰۰ میلی‌گرم	0 ± 0^a (۰)	0 ± 0^a (۰)

حروف انگلیسی مشابه در هر ستون نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P > 0/05$).

جدول ۴- میانگین روند انکوباسیون تخم ماهی کپور علفخوار تحت تأثیر غلظت‌های برخی کاتیون‌های مختلف روی اسپرم.

پارامتر	درصد لقاح	درصد ظهور لارو	طول لاروهای تازه هچ شده (میلی متر)	طول لاروها در آغاز تغذیه فعال (میلی متر)	درصد بازماندگی لارو تا شروع تغذیه فعال	غلظت یون/ تیمار
	حداکثر- حداقل	حداکثر- حداقل	حداکثر- حداقل	حداکثر- حداقل	حداکثر- حداقل	
تیمار شاهد	۹۰ ± ۰ ^b	۶۵ ± ۱۸/۰۳ ^a	۴/۳ ± ۰/۴ ^c	۴/۸۳ ± ۰/۲۹ ^b	۹۰/۰۳ ± ۰/۹۵ ^a	
	(۹۰-۹۰)	(۴۵-۸۰)	(۳/۹-۴/۷)	(۴/۵-۵)	(۸۹/۱-۹۱)	
۱۳۲	۸۰ ± ۵ ^a	۷۰ ± ۵ ^a	۳/۶۲ ± ۰/۱۵ ^b	۴/۱۱ ± ۰/۱۶ ^a	۹۳/۶۷ ± ۱/۵۳ ^c	منیزیم
	(۷۵-۸۵)	(۶۵-۷۵)	(۳/۴۵-۳/۷۵)	(۴-۴/۲۴)	(۹۲-۹۵)	
۲۲۸	۹۰ ± ۵ ^b	۶۰ ± ۵ ^a	۳/۸۳ ± ۰/۰۸ ^b	۴/۱۳ ± ۰/۱۶ ^a	۹۱/۴۹ ± ۰/۴۷ ^{ab}	(میلی گرم در لیتر)
	(۸۵-۹۵)	(۵۵-۶۵)	(۳/۷۷-۳/۹۲)	(۳/۹۹-۴/۳۱)	(۹۱-۹۲)	
۳۲۴	۸۰ ± ۵ ^a	۶۵ ± ۵ ^a	۳/۱۷ ± ۰/۱۶ ^a	۴/۳۲ ± ۰/۲۹ ^a	۹۲/۰۷ ± ۰/۹ ^{bc}	
	(۷۵-۸۵)	(۶۰-۷۰)	(۳-۳/۳۲)	(۴/۱-۴/۶۵)	(۹۱-۹۳)	
تیمار شاهد	۹۰ ± ۰ ^b	۶۵ ± ۱۸/۰۳ ^c	۴/۳ ± ۰/۴ ^b	۴/۸۳ ± ۰/۲۹ ^a	۹۰/۰۳ ± ۰/۹۵ ^a	
	(۹۰-۹۰)	(۴۵-۸۰)	(۳/۹-۴/۷)	(۴/۵-۵)	(۸۹/۱-۹۱)	
۱۲۰۰	۷۵ ± ۵ ^{ab}	۵۵ ± ۵ ^b	۳/۵۲ ± ۰/۱۵ ^a	۴/۴۵ ± ۰/۲۷ ^a	۹۰/۳ ± ۱/۱۹ ^a	پتاسیم
	(۷۰-۸۰)	(۵۰-۶۰)	(۳/۳۱-۳/۷۵)	(۴/۲۱-۴/۷۵)	(۸۹-۹۱/۳۵)	
۱۴۰۰	۸۰ ± ۵ ^b	۳/۳۳ ± ۵/۷۷ ^a	۰ ± ۰	۰ ± ۰	۰ ± ۰	(میلی گرم در لیتر)
	(۷۵-۸۵)	(۰-۱۰)	(۰-۰)	(۰-۰)	(۰-۰)	
۱۸۰۰	۷۰ ± ۵ ^a	۱/۶۷ ± ۲/۸۹ ^a	۰ ± ۰	۰ ± ۰	۰ ± ۰	
	(۶۵-۷۵)	(۰-۵)	(۰-۰)	(۰-۰)	(۰-۰)	
تیمار شاهد	۹۰ ± ۰ ^b	۶۵ ± ۱۸/۰۳ ^b	۴/۳ ± ۰/۴ ^b	۴/۸۳ ± ۰/۲۹ ^{ab}	۹۰/۰۳ ± ۰/۹۵ ^a	
	(۹۰-۹۰)	(۴۵-۸۰)	(۳/۹-۴/۷)	(۴/۵-۵)	(۸۹/۱-۹۱)	
۲۲۰۸	۷۰ ± ۵ ^a	۷۰ ± ۵ ^b	۳/۴۷ ± ۰/۲۴ ^a	۴/۵۸ ± ۰/۰۹ ^a	۹۲/۲۵ ± ۱ ^{bc}	سدیم
	(۶۰-۷۰)	(۶۵-۷۵)	(۳/۲۵-۳/۷۲)	(۴/۵-۴/۶۷)	(۹۱/۱-۹۳)	
۲۳۹۳	۷۰ ± ۵ ^a	۱۹/۶۷ ± ۲/۸۹ ^a	۴/۱۵ ± ۰/۱۹ ^b	۵/۷ ± ۰/۲۵ ^c	۹۰/۴۱ ± ۱/۲۳ ^{ab}	(میلی گرم در لیتر)
	(۶۵-۷۵)	(۲۲-۱۷)	(۴-۴/۳۶)	(۵/۴۵-۵/۹۵)	(۸۹-۹۱/۲)	
۲۵۷۶	۹۴/۳۳ ± ۳/۰۶ ^b	۷۵ ± ۵ ^b	۴/۶۳ ± ۰/۲۲ ^b	۵/۰۳ ± ۰/۰۸ ^b	۹۳/۲ ± ۰/۸۱ ^c	
	(۹۵-۸۹)	(۷۰-۸۰)	(۴/۴-۴/۸۴)	(۴/۹۶-۵/۱۲)	(۹۲/۳-۹۳/۹)	
تیمار شاهد	۹۰ ± ۰ ^d	۶۵ ± ۱۸/۰۳ ^c	۴/۳ ± ۰/۴ ^a	۴/۳۳ ± ۰/۲۹ ^a	۹۰/۰۳ ± ۰/۹۵ ^c	
	(۹۰-۹۰)	(۴۵-۸۰)	(۳/۹-۴/۷)	(۴/۵-۵)	(۸۹/۱-۹۱)	
۱۰۰۰	۶۰ ± ۵ ^c	۸۰ ± ۵ ^d	۴/۶۱ ± ۰/۳ ^a	۴/۶۶ ± ۰/۲۳ ^b	۹۲/۲۹ ± ۰/۹۱ ^c	کلسیم
	(۵۵-۶۵)	(۷۵-۸۵)	(۴/۳۲-۴/۹۲)	(۵/۳۴-۵/۶۳)	(۹۱/۴-۹۳/۲۱)	
۱۲۰۰	۵۰ ± ۵ ^b	۱۵ ± ۵ ^b	۴/۰۹ ± ۰/۱۸ ^a	۳/۹۳ ± ۰/۰۸ ^a	۸۵ ± ۲ ^b	(میلی گرم در لیتر)
	(۴۵-۵۵)	(۱۰-۲۰)	(۳/۹۸-۴/۳)	(۴/۹۷-۵/۲۳)	(۸۳-۸۷)	
۱۴۰۰	۵ ± ۵ ^a	۰/۶۷ ± ۱/۱۶ ^a	۰ ± ۰ ^a	۰ ± ۰ ^a	۰ ± ۰ ^a	
	(۰-۱۰)	(۰-۲)	(۰-۰)	(۰-۰)	(۰-۰)	

غلظت‌های مختلف یون منیزیم با تیمار شاهد وجود

اختلاف معنی‌دار از نظر درصد ظهور لارو بین

تحرک به ترتیب در محلول‌های شامل ۲۳۹۳ میلی‌گرم در لیتر کلرید سدیم و ۱۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلرید پتاسیم مشاهده گردید. یون‌های پتاسیم و سدیم نقش کلیدی در فعال‌سازی اسپرم کپور علفخوار دارند که این موضوع در مورد ماهی کپور معمولی *Cyprinus Krasznai carpio* و همکاران، (۱۹۹۵)، کپور جاوا *Morita Puntius javanicus* و همکاران، (۲۰۰۶)، باربوس *Barbus barbatus* (Alavi) و همکاران، (۲۰۰۹) و ماهی بنی *Barbus sharpeyi* (Alavi) و همکاران، (۲۰۱۰) تأیید گردیده است. همچنین درصد اسپرم‌های متحرک ماهی *Barbus sharpeyi* در محلول فعال‌کننده شامل کلرید سدیم به میزان چشم‌گیری بیش‌تر از آب مقطر بود (Alavi و همکاران، ۲۰۱۰). در خانواده کپورماهیان، یون پتاسیم افزایش‌دهنده میزان درصد تحرک اسپرم می‌باشد (Morisawa و همکاران، ۱۹۸۳) و در ماهی کپور (Cosson و Billard، ۱۹۹۲). حال آن‌که، کانال‌های پتاسیمی می‌توانند موجب کاهش یا توقف تحرک اسپرم ماهی کپور معمولی نیز گردند (Krasznai و همکاران، ۱۹۹۵). هر چند لزوم انجام مطالعات گسترده‌تری در زمینه نقش یون پتاسیم در فعال‌سازی تحرک اسپرم در خانواده کپورماهیان احساس می‌شود. در مطالعه حاضر، میزان درصد تحرک اسپرم کپور علفخوار در تیمار شاهد (بدون کاتیون) بیش‌تر از سایرین بود. طول دوره تحرک اسپرم ماهی گورخری، *Danio rerio* در زمانی که با آب مقطر فعال شدند، دارای بیش‌ترین میزان بود (Jing و همکاران، ۲۰۰۹). اطلاعات محدودی درباره تأثیر منیزیم بر تحرک اسپرم ماهیان استخوانی که شامل کپور علفخوار نیز می‌گردد، موجود می‌باشد (Alavi و همکاران، ۲۰۰۴). در این پژوهش، غلظت‌های متفاوت کلرید منیزیم تأثیری بر درصد تحرک اسپرم نداشت و این در حالی است که برخی مطالعات بیانگر نقش برجسته منیزیم در

نداشت ($P > 0/05$) اما اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف یون پتاسیم، سدیم و کلسیم با تیمار شاهد وجود داشت ($P < 0/05$). بیش‌ترین میانگین طول لاروهای تازه هچ‌شده در تیمار شاهد یون‌های منیزیم و در غلظت ۲۵۷۶ میلی‌گرم یون سدیم و در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم یون کلسیم به دست آمد. اختلاف معنی‌داری از نظر طول لاروهای تازه هچ‌شده بین غلظت‌های مختلف یون منیزیم، پتاسیم، سدیم با تیمار شاهد وجود داشت ($P < 0/05$). اما اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف یون کلسیم با تیمار شاهد وجود نداشت ($P > 0/05$). نتایج نشان داد، بیش‌ترین میانگین طول لاروها در مرحله آغاز تغذیه فعال در تیمار شاهد یون‌های منیزیم و پتاسیم، در غلظت ۲۳۹۳ میلی‌گرم سدیم و در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم یون کلسیم دیده شد. اختلاف معنی‌داری از نظر طول لاروها در مرحله آغاز تغذیه فعال بین غلظت‌های مختلف یون منیزیم، سدیم و کلسیم با تیمار شاهد وجود داشت ($P < 0/05$). اما اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف یون پتاسیم با تیمار شاهد وجود نداشت ($P > 0/05$). نتایج نشان داد که بیش‌ترین میانگین درصد بازماندگی لارو تا شروع تغذیه فعال در غلظت ۱۳۲ میلی‌گرم یون منیزیم، در تیمار شاهد و در غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم یون پتاسیم، در غلظت ۲۵۷۶ میلی‌گرم یون سدیم و در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم یون کلسیم وجود داشت. با توجه به نتایج اختلاف معنی‌دار از نظر درصد بازماندگی لارو تا شروع تغذیه فعال بین غلظت‌های مختلف یون منیزیم، سدیم و کلسیم با تیمار شاهد وجود داشت ($P < 0/05$), ولی اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف یون پتاسیم با تیمار شاهد وجود نداشت ($P > 0/05$) (جدول ۵).

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، بیش‌ترین میزان طول دوره

Billard و همکاران، ۱۹۹۵). موفقیت لقاح در زمان استفاده از یک محلول فعال‌کننده مناسب و شامل مقادیر کافی یون‌ها که موجب افزایش طول دوره تحرک اسپرم می‌گردد، می‌تواند بهبود یابد. در مطالعه حاضر، بالاترین میزان تحرک اسپرم در محدوده غلظت‌های ۲۵۷۶-۲۳۹۳ میلی‌گرم در لیتر کلرید سدیم به دست آمد، از این‌رو، بیش‌ترین درصد لقاح و نرخ تفریح در تیمارهای نام‌برده مشاهده گردید. همچنین در تیمار شامل ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلرید کلسیم، نرخ تفریح دارای مقدار بیشینه بود. براساس نتایج مطالعه حاضر، می‌توان یون‌های کلسیم و سدیم را به‌عنوان عوامل برجسته تأثیرگذار بر توان باروری اسپرم ماهی کپور علفخوار معرفی نمود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان و همه کارکنان مزرعه تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی تعاونی شماره ۱۲ واقع در روستای آقا سیدشریف شهرستان رشت سپاسگزاری می‌گردد.

فعال‌سازی تحرک اسپرم می‌باشند (Cosson و همکاران، ۱۹۹۹). Lim و همکاران (۲۰۱۱)، بیان داشتند که پارامترهای تحرک اسپرم ماهی *Larimichthys polyactis* در محلول‌های شامل ۰/۲ مول کلرید منیزیم بعد از فعال‌سازی دارای مقادیر بیش‌تری بود. آن‌ها همچنین مشاهده نمودند که غلظت بیش از ۰/۲ کلرید منیزیم مول موجب کاهش طول دوره تحرک گردید. مطالعه حاضر ارایه‌دهنده اولین گزارش از تأثیر منفی یون منیزیم در غلظت‌های متفاوت، بر تحرک اسپرم کپور علفخوار می‌باشد.

براساس برخی گزارش‌ها، کلسیم خارجی عامل پیش‌نیاز برای آغاز تحرک اسپرم در ماهی کپور می‌باشد (Krasznai و همکاران، ۲۰۰۰). به‌طوری‌که تحرک اسپرم ۳۰ ثانیه پس از افزودن ۱۰-۴ مول کلرید کلسیم قابل مشاهده است. در این پژوهش، درصد و طول دوره تحرک اسپرم در محلول‌های شامل غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر یا بیش‌تر کلرید کلسیم به صفر رسید. در این راستا، پژوهش‌ها نشان‌دهنده اهمیت وجود کلسیم در فعال‌سازی اسپرم ماهیان می‌باشد (Alavi و همکاران، ۲۰۰۴؛ Alavi و Cosson، ۲۰۰۶). تأثیر برجسته تحرک بر توانایی لقاح اسپرم در مطالعات گذشته به اثبات رسیده است

منابع

عبدلی، ا.، ۱۳۷۸. ماهیان آب‌های داخلی ایران. انتشارات موزه طبیعت و حیات وحش ایران. شماره ۲۱۳۲، تهران، ص ۳۷۷.

- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2002. Sperm motility in fishes: (III) Mechanisms of activation of the motility of spermatozoa. 26th Annual Larval Fish Conference, July 22-26, Bergen, Norway, 29p.
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2005. Sperm motility and fertilizing ability in the Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *Aquaculture Research* 36, 841-850.
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2006. Sperm motility in fishes: (II) Effects of ions and osmolality. *Cell Biology International* 30, 1-14.
- Alavi, S.M.H., Rodina, M., Policar, T., Linhart, O., 2009. Relationships between semen characteristics and body size in *Barbus barbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. *Comparative Biochemistry and Physiology* 153, 430-437.
- Alavi, S.M.H., Jorfi, E., Hatf, A., Mortezaei, S.A.S., 2010. Sperm motility and seminal plasma characteristics in *Barbus sharpeyi* (Gunther, 1874). *Aquaculture Research* 41, 688-694.
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., Karami, M., Amiri, B.M., Akhoundzadeh, M.A., 2004. Spermatozoa

- motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: Effects of pH, dilution ratio, ions and osmolality. *Reproduction* 128, 819-828.
- Billard, R., Cosson, M.P., 1992. Some problem related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology* 261, 122-131.
- Billard, R., Jensen, J.O.T., 1996. Gamete removal, fertilization and incubation. In: Pennell, W., and Barton, B.A. (eds). *Principles of Salmonid Culture*. Elsevier Publication, Amsterdam, Netherlands. pp. 291-364.
- Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., Linhart, O., 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* 129, 95-112.
- Bozkurt, Y., Ogretmen, F., Ercin, U., Yildiz, U., 2008. Seminal plasma composition and its relationship with physical spermatological parameters of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) semen: with emphasis on sperm motility. *Journal of Aquaculture Research* 39, 1666-1672.
- Bozkurt, Y., Ogretmen, F., Secer, F.S., Ercin, U., 2009. Effects of Seminal Plasma Composition on Sperm Motility in Mirror Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture Bamidgh* 61 (4), 307-314.
- Bromage, N.R., Cumaradataunga, R., 1988. Egg production in the rainbow trout in recent advances. In: Muir, J.F. and Robert, R. J. (eds). *Aquaculture* 39, 63-139.
- Cosson, J., Billard, R., Gibert, C., Dreanno, C., Suquet, M., 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: Gagnon, C. (ed). *The Male Gamete: From Basic to Clinical Applications*, Vienna II, Cache River Press. Illinois. pp. 161-186.
- Hanjavanit, C., Kitancharoen, N., Rakmanee, C., 2008. Experimental Infection of Aquatic Fungi on Eggs of African Catfish (*Clarias gariepinus* Burch). *KKU Science* 36, 36-43.
- He, S., Jenkins, K., 2004. Activation of sperm motility in striped bass via a CAMP-independent pathway. *Theriogenology* 61, 1487-1498.
- Jing, R., Huang, C., Bai, C., Tanguay, R., Dong, Q. 2009. Optimization of activation, collection, dilution, and storage methods. *Aquaculture* 290, 165-171.
- Krasznai, Z., Marian, T., Balkay, L., Gasper, R.J., Tron, L., 1995. Potassium channels regulate hypo-osmotic shock-induced motility of Common Carp, *Cyprinus carpio*, sperm. *Aquaculture* 129, 123-128.
- Krasznai, Z., Marian, T., Izumi, H., Damjanovich, S., Balkay, L., Tron, L., 2000. Membrane hyper polarization removes inactivation of Ca^{2+} channels leading to Ca^{2+} influx and initiation of sperm motility in the common carp. *Biophysics* 97, 2052-2067.
- 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 spermatozoa metabolism. *Aquaculture* 163, 163-181.
- Lim, H.K., Min, B.H., Park, M.S., Son, M.H., Lee, J.U., Chang, Y.J., 2011. Effects of varying dilutions, pH, temperature and cations on spermatozoa motility in fish *Larimichthys polyactis*. *Environmental Biology* 32, 271-276.
- Linhart, O., Rodina, M., Bastl, J., Cosson, J., 2003. Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca*). *Applied Ichthyology* 19, 177-181.
- Marian, T., Krasznai, Z., Balkay, L., Balazs, M., Emri, M., Bene, L., 1993. Hypoosmotic shock inducing osmolality dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 41, 291-298.
- Morisawa, M., 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleost. *Zoological Science* 2, 605-615.
- Morisawa, M., Suzuki, K., 1980. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleost. *Science* 210, 1145-1147.
- Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., Yasuda, K., 1983. Effect of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *Journal of Experimental Zoology* 107, 95-103.
- Morita, M., Okuno, M., Susilo, E.S., Setyo, B.P., Martarini, D., Harnadi, L., Takemura, A.,

2006. Changes in sperm motility in response to osmolality/ Ca^{2+} in three Indonesian fresh water teleost: Goby (*Oxyeleotris marmorata*), Java carp (*Puntius javanicus*), and catfish (*Clarias batrachus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 143, 361-367.
- Ohtah, T., Unuma, T., Tsuji, M., Yoshioka, M., Kashiwagi, M., 2001. Effects of Bicarbonate Ions and pH on Acquisition and Maintenance of Potential for Motility in Ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck et Schlegel (*Osmeridae*), Spermatozoa. *Aquaculture Research* 32, 385-392.
- Tabares, J., Ruiz, T., Arboleda, L., Olivera, M., 2007. Effect of some ions on sperm activation in *Brycon henni*. *Journal of Acta Biologica Colombiana* 12 (1), 87-98.
- Verma, D.K., Routray, P., Dash, C., Dasgupta S., Jena, J.K., 2009. Physical and biochemical characteristics of semen and ultrastructure of spermatozoa in six carp species. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 9, 67-76.

Effect of cations on sperm motility and fertilization capacity in Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

M. Ahmadnejad^{1*}, Sh. Baradaran Nooyeri²

¹ Inland Water Aquaculture Research Center, Bandar Anzali, Iran

² International Sturgeon Research Organization, Rasht, Iran

Abstract

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 *Ctenopharyngodon idella*. To survey of the effects of ions on sperm motility, Na^+ (NaCl) (2208, 2393 and 2576 mg/L), K^+ (KCl) (1200, 1400 and 1800 mg/L), Mg^{2+} (MgCl_2) (132, 228 and 324 mg/L) and Ca^{2+} (CaCl_2) (1000, 1200 and 1400 mg/L) were used. The results showed that, the highest duration of sperm motility and fertilization rate were obtained in solutions containing 2393 and 2576 ml^{-1} NaCl ($P < 0.05$), respectively. Solutions containing different doses of KCl caused a decrease in percentage of motile spermatozoa, fertilization and hatching rates ($P < 0.05$). The duration of sperm motility decreased in solution containing MgCl_2 and immediately after activating by 1200 mg l^{-1} CaCl_2 motility was ceased. Highest hatching rate (80 ± 5 mg/L), survival rate (92.29 ± 0.91 mg/L) were observed in solution containing 1000 mg l^{-1} CaCl_2 . With regard to our results can be conclude that NaCl and CaCl_2 are influencing factors involved in fertilizing capacity of grass carp.

Keywords: Fertilization; Grass carp; Hatching; Ions; Sperm

* Corresponding Authors; Email: m_ahmadnezhad@yahoo.com