

نقش مایع تخمدانی در قابلیت لقاح مصنوعی ماهی قزل-آلای رنگین-کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

آذین محقق^۱ ثمرین^۱ محمد رضا احمدی^{۲*}

۱) گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، قائم شهر-ایران.
۲) گروه بهداشت و بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران-ایران.

(دریافت مقاله: ۱۲ بهمن ماه ۱۳۸۷، پذیرش نهایی: ۱۰ آذرماه ۱۳۸۸)

چکیده

در حال حاضر ایران یکی از مهمترین کشورهای جهان در تولید ماهی قزل-آلای رنگین کمان به حساب می آید و از آنجائی که تولید بچه ماهی در این میان یک امر حیاتی است لذا در این مطالعه، نقش مایع تخمدانی در تکثیر مصنوعی ماهی قزل-آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد سنجش قرار گرفت. همچنین اثرات متقابل احتمالی مایع تخمدانی مولدین مختلف بر تخمک های یکدیگر تا مدت زمان یک ساعت نگهداری توأم آن ها در دمای حدود ۴ درجه سانتیگراد بررسی گردید. سنجش کیفیت تخمک ها از طریق اندازه گیری نرخ چشم زدگی و تفریح تخم ها صورت گرفت. برای این منظور سه آزمایش متفاوت انجام گردید. نتایج آزمایش های اول و دوم نشان دادند که نرخ چشم زدگی و تفریح تخمک هایی که همراه با مایع تخمدانی و یا بدون مایع تخمدانی لقاح یافته بودند، تفاوت قابل ملاحظه ای از جهت آماری با یکدیگر نداشتند ($p > 0.05$). اعداد مربوط به نرخ چشم زدگی در تیمارهای آزمایش اول به ترتیب ۹۷/۱ و ۹۷/۶ درصد و در تیمارهای آزمایش دوم به ترتیب ۹۹/۱ و ۹۷/۷ درصد بودند. در آزمایش سوم نرخ چشم زدگی و تفریح تخمک هایی که بلافاصله پس از استحصال لقاح یافتند، ۸۸/۷ و ۸۶/۸ درصد به دست آمد. این اعداد در مورد تخمک هایی که ۶۰ دقیقه پس از نگهداری توأم لقاح داده شدند، ۸۴/۶ و ۸۶/۳ درصد اندازه گیری گردید. لذا نتایج کلیه آزمایش ها نشان دادند که مایع تخمدانی تأثیرات متقابل بر پارامترهای لقاح مصنوعی تخم ها نداشته و شرایط نگهداری در ۴ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت نیز بر باروری تخم های بی اثر می باشد.

واژه های کلیدی: مایع تخمدانی، اثرات متقابل، قابلیت لقاح، قزل-آلای رنگین کمان.

تخمدانی مولدین مختلف بر تخمک های یکدیگر در عمل لقاح می تواند قابل ملاحظه و مهم باشد. همچنین از آنجا که ممکن است این اثرات با گذر زمان مشخص گردند و نیز با توجه به آن که معمولاً عملیات تکثیر مصنوعی در کارگاه ها بیش از یک ساعت به طول نمی انجامد، لذا تأثیر زمان بر اثرات متقابل آن ها نیز به مدت ۶۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت.

تاکنون مطالعاتی در زمینه نگهداری تخمک های آزاد ماهیان در محوطه شکمی (۱۶، ۱۲، ۱۱، ۸، ۴، ۲، ۱) و نیز در خارج از بدن آن ها (۱۴، ۹، ۵) صورت گرفته است. لیکن هیچ پژوهشی در زمینه نگهداری توأم تخمک مولدین مختلف انجام نشده است. در حالیکه باید به این امر توجه ویژه ای مبذول داشت. بنابراین در این مطالعه، ۳ آزمایش به منظور بررسی اثرات فردی و متقابل مایع تخمدانی مولدین در تکثیر مصنوعی ماهی قزل-آلای رنگین کمان انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

مولدین: مولدین ۴ ساله قزل-آلای رنگین کمان به عنوان ماهیان آزمایشی انتخاب و در استخرهای موجود در فضای باز نگهداری شدند. مطالعه طی فصول پاییز و زمستان ۱۳۸۵ در مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت صورت گرفت. جهت نگهداری مولدین از آب رودخانه با میانگین دمای ۱۱±۴ درجه سانتیگراد استفاده گردید. مولدین تا مدت ۶ هفته قبل از زمان احتمالی اوولاسیون از غذای تجاری تغذیه می نمودند. به منظور کاهش

مقدمه

آزاد ماهیان در مقایسه با سایر گونه های ماهیان دارای تخمک های بزرگتری بوده و در نتیجه تعداد تخمک های آنان در هر مولد کم می باشد. از این رو ضرورت توجه به فاکتورهای مؤثر بر موفقیت لقاح در آن ها آشکارتر می گردد. در شرایط پرورشی، پس از اوولاسیون (رها شدن تخمک ها از لایه های نگهدارنده آن ها در تخمدان و ورود آن ها به محوطه شکمی)، مایع تخمدانی یا مایع سلومیک به عنوان مایع نگهدارنده تخمک ها در محوطه شکمی عمل نموده و تخمک ها تا زمان تخم کشی به صورت غوطه ور در آن باقی می مانند (۱۵). به نظر می رسد که وجود یا عدم وجود مایع تخمدانی در تکثیر مصنوعی یکی از مهمترین عوامل مؤثر بر میزان و مدت زمان تحرک اسپرم ها بوده و از این طریق بر موفقیت لقاح تأثیرگذار می باشد (۷). همچنین در مراکز تکثیر، مولدین ماده قزل-آلای رنگین کمان هر چند مدت یک بار مورد معاینه قرار می گیرند تا تخمک هایی که در طی این دوره اووله (سیال) شده اند، استحصال گردند (۱۶). از این رو فاصله زمانی مابین اوولاسیون و تخم کشی در مولدین مورد استفاده برای تکثیر مصنوعی متفاوت است. در طی دوره پس از اوولاسیون به تدریج تغییراتی مرفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در محتوای تخمک ها و ترکیب مایع تخمدانی اتفاق می افتد (۱۵، ۱۱، ۱۰). از آنجا که در مراکز تکثیر معمولاً تخمک های چند مولد ماده با یکدیگر مخلوط شده و سپس توسط اضافه نمودن اسپرم لقاح می یابند، لذا اثرات متقابل مایع



استرس، جهت بررسی ایجاد اولواسیون و نیز عملیات تکثیر مصنوعی، مولدین با محلول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر MS222 بیهوش می‌شدند.

آزمایش اول: ابتدا کل مولدین موجود در یک جمعیت همگن اولیه (حدود ۱۰۰۰ عدد) بیهوش شده و سپس مورد معاینه قرار گرفتند. معاینه از طریق اعمال فشار آرام به محوطه شکمی از ناحیه سینه‌ای به سمت منفذ تناسلی صورت گرفت. با این روش تخمک‌ها از منفذ تناسلی مولدینی که اولواسیون تخمک‌ها در آن‌ها صورت گرفته است خارج می‌گردند (۱۶). سپس از میان آن‌ها ۱۵ عدد مولد ماده که دارای تخمک‌های سیال بودند به صورت تصادفی و با میانگین وزن 140.2 ± 6.5 گرم انتخاب شدند. از هر یک از ۱۵ عدد مولد فوق‌الذکر که توسط نشان‌های رنگی علامت‌گذاری شده بودند، ۲ دسته ۲۰ گرمی تخمک استحصال گردید. مایع تخمدانی دسته‌های اول جدا نشد، در حالیکه مایع سلومیک دسته‌های دوم توسط توری ریز چشمه یک میلیمتری جدا گردید. جهت استحصال اسپرم، مولدین را ابتدا بیهوش و سپس بدن آن‌ها به خوبی توسط حوله خشک می‌گردید. به منظور حصول اطمینان از عدم مخلوط شدن اسپرم با محتویات دستگاه گوارش و دفع ادرار، از اسپرم اولیه آن‌ها استفاده نمی‌شد. به همین روش اسپرم مورد استفاده برای تکثیر از تعداد ۱۰ عدد مولد نر استحصال شده و به خوبی مخلوط و همگن می‌گردید. سپس عمل لقاح برای هر دسته به صورت جداگانه صورت گرفت. اعمال فوق‌الذکر عیناً برای ۱۴ مولد دیگر نیز انجام پذیرفت.

آزمایش دوم: در این آزمایش، ۱۵ مولد ماده استفاده شده در آزمایش اول به ۵ گروه ۳ تایی تقسیم و سپس از هر مولد مجدداً ۲ دسته ۲۰ گرمی تخمک استحصال گردید. مایع تخمدانی دسته‌های اول جدا نشد، لیکن مایع تخمدانی دسته‌های دوم جدا گردید. تخمک‌های همراه با مایع تخمدانی هر یک از ۳ مولد ماده با یکدیگر مخلوط و لقاح داده شدند. سپس تخمک‌های بدون مایع تخمدانی همین ۳ مولد نیز با یکدیگر مخلوط و لقاح یافتند. این عمل برای ۴ گروه ۳ تایی دیگر از مولدین نیز به همین نحوه انجام پذیرفت.

آزمایش سوم: در این آزمایش، ۱۵ عدد مولد ماده دیگر با میانگین وزن 135 ± 14.45 گرم که دارای تخمک‌های سیال بودند مطابق روش ذکر شده در آزمایش اول به صورت تصادفی از جمعیت همگن اولیه مولدین انتخاب و به ۵ گروه ۳ تایی تقسیم گردیدند. پس از بیهوش نمودن ۳ ماهی گروه اول، ۷ دسته ۲۰ گرمی تخمک از هر مولد استحصال گردید و مایع تخمدانی آن‌ها جدا نشد. دسته‌های اول تخمک‌های هر ۳ مولد با یکدیگر مخلوط شده و بلافاصله (دقیقه ۰) لقاح یافتند. هم‌زمان دسته‌های دوم تخمک‌های همین ۳ مولد با یکدیگر مخلوط شده و ۱۰ دقیقه پس از نگهداری توأم لقاح داده شدند. به همین ترتیب تیمارهای سوم، چهارم، پنجم، ششم و هفتم آزمایشی معرف تخمک‌هایی از این ۳ مولد بودند که به ترتیب مدت ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه پس از اختلاط و نگهداری توأم تخمک‌های آن‌ها با یکدیگر لقاح داده شدند. این عمل برای ۴ گروه ۳ تایی دیگر از مولدین نیز به همین صورت انجام پذیرفت.

کلیه عملیات صحرایی لقاح در این تحقیق در درجه حرارت حدود ۴ درجه سانتیگراد که درجه حرارت سالن تکثیر در زمان آزمایش بود صورت گرفته است. جهت سنجش درجه حرارت نیز از یک میزان الحراره جیوه‌ای با دقت ۰/۵ درجه سانتیگراد استفاده گردید.

تعیین دوره زمانی تحرک اسپرم: دوره زمانی تحرک اسپرم در دو محلول مایع تخمدانی و آب مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا یک لایه بسیار نازک از اسپرم مخلوط و همگن شده که از ۱۰ مولد نر استحصال گردیده بود بر روی لام گسترش داده می‌شد و سپس یک قطره از محلول مایع تخمدانی و یا آب به فضای مابین لام و لامل تزریق می‌گردید. دوره زمانی تحرک اسپرم توسط میکروسکوپ نوری و تاهنگامی که تحرک ۹۵ الی ۹۹ درصد سلول‌ها متوقف شوند، اندازه‌گیری می‌شد (۳). این عمل حداقل ۱۰ مرتبه در هر نوبت آزمایش به عنوان ۱۰ تکرار آزمایشی و با استفاده از کرنومتر صورت می‌گرفت.

انکوباسیون تخم‌ها: در کلیه آزمایش‌های فوق‌الذکر تخم‌ها تا زمان چشم‌زدگی و تفریح در سینی‌های چشمه درشت و سرپوشیده داخل سالن انکوباسیون نگهداری شدند. آب مورد استفاده از طریق چشمه تأمین شده و درجه حرارت آن در طول دوره انکوباسیون 10 ± 1 درجه سانتیگراد اندازه‌گیری گردید. به منظور جلوگیری از ایجاد آلودگی‌های قارچی، تخم‌های تمام تیمارها یک روز در میان و هر بار به مدت یک ساعت توسط مالاشیت گرین با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر ضد عفونی می‌گردیدند.

اندازه‌گیری پارامترهای تولید مثلی: فاکتورهای اندازه‌گیری شده در طی دوره انکوباسیون، درصد چشم‌زدگی و درصد تفریح بود. حدود ۲۵ روز پس از لقاح، عمل شوک‌دهی مکانیکی (سیفون کردن تخم‌ها به داخل یک ظرف پر از آب) صورت گرفت و سپس تخم‌های چشم‌زده از تخم‌های چشم‌نزده تفکیک و درصد چشم‌زدگی تعیین شد. تعداد لاروها نیز شمارش و درصد تخم چشم‌زده و لارو تولیدی با محاسبه زیر به دست آمد.

$$100 \times (\text{تعداد کل تخم‌ها} / \text{تعداد تخم‌های چشم‌زده}) = \text{درصد چشم‌زدگی}$$

$$100 \times (\text{تعداد کل تخم‌ها} / \text{تعداد لاروهای تفریح شده}) = \text{درصد تفریح}$$

طرح آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها: در آزمایش‌های اول و دوم به منظور بررسی تفاوت‌های مابین دو تیمار آزمایشی (تخمک‌های لقاح یافته با مایع تخمدانی و بدون مایع تخمدانی) از آزمون t استیودنت (جفت شده) استفاده گردید. در آزمایش سوم، طرح آماری مورد استفاده طرح کاملاً تصادفی بود. در قالب این طرح، ۷ دوره زمانی نگهداری توأم تخمک مولدین مختلف به عنوان ۷ تیمار آزمایشی و هر کدام از ۵ گروه ۳ تایی مولدین ماده به عنوان تکرارهای آزمایشی در نظر گرفته شدند. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۰/۰۵ صورت گرفت. کلیه آزمون‌های فوق‌الذکر توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱ انجام پذیرفت.

نتایج

آزمایش اول: درصد چشم‌زدگی تخمک‌هایی که با مایع تخمدانی لقاح یافته بودند (تیمار اول) به میزان $97/1 \pm 1/7$ درصد (میانگین \pm انحراف معیار)



References

1. Aegerter, S., Jalabert, B. (2004) Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 231: 59-71.
2. Azuma, T., Ohta, H., Oda, S., Muto, K., Yada, T., Unuma, T. (2003) Changes in fertility of rainbow trout eggs retained in coelom. *Fish. Sci.* 69: 131-136.
3. Billard, R. (1983) Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Reprod. Fert.* 68: 77-84.
4. Bonnet, E., Jalabert, B., Bobe, J. (2003) A 3-Day in vitro storage of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* unfertilised eggs in coelomic fluid at 12 °C does not affect development success. *Cybio*. 27: 47-51.
5. Bonnet, E., Fostier, A., Bobe, J. (2007) Characterization of rainbow trout egg quality: A case study using four different breeding protocols, with emphasis on the incidence of embryonic malformations. *Theriogenology*. 67: 786-794.
6. Craik, J. C. A., Harvey, S. M. (1984) Biochemical changes associated with overripening of the eggs of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*. 37: 347-357.
7. Erdahl, A. W., Cloud, J. G., Graham, E. F. (1987) Fertility of rainbow trout *Salmo gairdneri* gametes: gamete viability in artificial media. *Aquaculture*. 60: 23-332.
8. Gaudemar, B. D. E., Beall, E. (1998) Effects of overripening on spawning behaviour and reproductive success of Atlantic salmon females spawning in a controlled flow channel. *J. Fish. Biol.* 153: 434-446.
9. Goetz, F. W., Coffman, M. A. (2000) Storage of unfertilized eggs of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in artificial media. *Aquaculture*. 184: 267-276.
10. Jensen, J.O.T., Alderdice, D.F. (1984) Effect of temperature on short-term storage of eggs and sperm of chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Aquaculture*. 37: 251-265.
11. Lahnsteiner, F. (2000) Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the overripening of rainbow trout eggs. *Fish. Physiol.*

به طور مثال نشان داده شده است که در طی دوره پس از اوولاسیون و با افزایش ماندگاری تخمکها در محوطه شکمی می توان شاهد کاهش pH (۱۱،۱۵)، کاهش میزان اسمولالیته (۱)، افزایش مقدار اسیدهای چرب (۱۱)، افزایش غلظت پروتئینها (۱۰،۱۱) و نیز افزایش فعالیت های آنزیمی (۱۱،۱۵) بود. در واقع از آنجا که فاصله زمانی مابین اوولاسیون و تخمکشی در مولدین مختلف، متفاوت می باشد انتظار می رفت اثرات متقابل منفی در این راستا به وجود آیند. لیکن نتایج حاصل نشان دادند که در دمای حدود ۴ درجه سانتیگراد، نگهداری توأم تخمک مولدین مختلف به همراه مایع تخمدانی، حداقل به مدت ۶۰ دقیقه هیچ تأثیر منفی بر کیفیت تخمکها نخواهد داشت. بایستی به این نکته اشاره نمود که معمولاً در مراکز تکثیر نیز عملیات تکثیر مصنوعی بیش از یک ساعت به طول نمی انجامد. لیکن در مواردی ممکن است مراکز تکثیر به دلایل مختلف نظیر کمبود مولدین نرمایل به نگهداری توأم تخمک مولدین باشند که در چنین مواردی بایستی اثرات نگهداری توأم تخمک مولدین در زمان های طولانی تر نیز بررسی گردد. همچنین گزارش شده است که دوره زمانی حفظ کیفیت تخمک در مایع تخمدانی به شدت وابسته به درجه حرارت می باشد (۱۰،۱۸) و درجات حرارت پایین تر منجر به افزایش دوره زمانی حفظ کیفیت تخمکها می گردند (۹). دمای نگهداری تخمکها در مطالعه حاضر نسبتاً پایین بود، لذا مطالعاتی که در آنها نگهداری توأم تخمک مولدین مختلف در ماههای بالاتر و به مدت بیش از ۶۰ دقیقه صورت گیرند، می توانند نتایج مطالعه حاضر را کامل تر نمایند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت ها و پشتیبانی های معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه تهران به جهت پرداخت هزینه های این تحقیق و نیز از کارکنان محترم مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت، به خصوص جناب آقایان مهندس علی پاشازانوسی و افشین مسلمی، به دلیل مساعدت های ایشان تشکر و قدردانی می گردد.



- Biochem. 23: 107-118.
12. Mohagheghi, Samarin, A., Ahmadi, M. R., Azuma, T., Rafiee, G. R., Mojazi, Amiri, B., Naghavi, M. R. (2008) Influence of the time to egg stripping on eyeing and hatching rates in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* under cold temperatures. *Aquaculture*. 278: 195-198.
 13. Mylonas, C. C., Hinshaw, J. M., Sullivan, C. V., (1992) GnRH-induced ovulation of brown trout *Salmo trutta* and its effect on egg quality. *Aquaculture*. 106: 379-392.
 14. Niksirat, H., Sarvi, K., Mojazee, Amiri B., Hatef, A. (2007) Effects of storage duration and storage media on initial and post-eyeing mortality of stored ova of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 262: 528-531.
 15. Rime, H., Guitton, N., Pineau, C., Bonnet, E., Bobe, J., Jalabert, B. (2004) Post-ovulatory ageing and egg quality: A proteomic analysis of rainbow trout coelomic fluid. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2: 26-31.
 16. Springate, J. R. C., Bromage, N. R., Elliott J. A. K., Hudson, D. L. (1984) The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eyeing, hatch and swim-up in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*. 43: 313-322.
 17. Wilcox, K. W., Stoss, J., Donaldson, E. M. (1984) Broken eggs as a cause of infertility of coho salmon gametes. *Aquaculture*. 40: 77-87.
 18. Withler, F. C., Morley, R. B. (1968) Effects of chilled storage on viability of stored ova and sperm of sockeye and pink salmon. *J. Fish. Res. Board Can.* 25: 2695-2699



THE ROLE OF COELOMIC FLUID IN FERTILIZATION OF RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) OOCYTES

Mohagheghi Samarin, A.¹, Ahmadi, M. R.^{2*}

¹Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Ghaemshahr Branch, Islamic Azad University Tehran, Tehran-Iran.

²Department of Health and Aquatic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

(Received 31 January 2009 , Accepted 1 December 2009)

Abstract:

Iran is one of the most important Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) producing countries in the world and fingerling production is the key factor for this industry. The present experiment was conducted to determine the role of the coelomic fluid in artificial fertilization and to study the interactive effect of different brood fish coelomic fluid on fertilization process during 60 min storage at 4°C. The egg quality was evaluated through the rate of eyed and hatched eggs where these indices applied with and without coelomic fluid. In the first two trials, the rate of egg fertilization with and without coelomic fluid did not exhibit significant difference ($p>0.05$). Eyeing rates were 97.1% and 97.6% for trial I and 99.1% and 97.7% for trial II, respectively. In next trial the eyeing and hatching rate were 88.7% and 86.8% for the eggs fertilised immediately after stripping wheas for those fertilised 60 min. after integrated storage these values were 86.3% and 84.6% respectively ($p>0.05$). we concluded that the coelomic fluid has no interactive effect on artificial fertilization and the quality of egg fecundity is not influenced by the fertilisation process during 60 min storage at 4°C.

Keywords: coelomic fluid, interactive effects, fertilization ability, *Oncorhynchus mykiss*.

*Corresponding author's email: mahmadi@ut.ac.ir, Tel: 021-61117092, Fax:021-66933222

