مجله علمی شیلات ایران ۳۱(٦) ۱۷-۲٦ (DOI): 10.22092/ISFJ.2023.128582

CC BY

مقاله علمی – پژوهشی:

تاثیر ماده رقیق کننده اسپرم بر برخی از شاخص‌های تکثیر حاصل از تلاقی ماهیان نر تغییرجنسیت یافته (xx) و معمولی با ماهی ماده قزل آلای رنگین کمان

اسماعیل کاظمی*[۱]، ابوالحسن راستیان‌نسب[۱]، سید عبدالحمید حسینی[۱]، جواد مهدوی جهان آباد[۱]، عیسی فلاحت[۱]

*Esmaeil.kazemi.1986@gmail.com

۱- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱٤۰۱ تاریخ پذیرش: بهمن ۱٤۰۱

چکیده

با وجود اهمیت تولید بچه ماهی تک جنس، به دلیل عدم تکامل گناد در ماهیان نر تغییر جنسیت یافته قزل‌آلای رنگین‌کمان و نبود لوله اسپرم‌بر، استفاده از انواع رقیق‌کننده جهت بهبود کیفیت اسپرم ضروری است. در این مطالعه به منظور بررسی تاثیر ماده رقیق‌کننده اسپرم‌بر برخی از شاخص‌های تکثیر، نتایج حاصل از اجرای تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) لقاح اسپرم رقیق شده ماهی نر تغییر جنسیت یافته با تخمک معمولی، (۲) لقاح اسپرم معمولی با تخمک معمولی و (۳) لقاح اسپرم معمولی رقیق شده با تخمک معمولی مقایسه شدند. بر اساس نتایج این مطالعه، درصد لقاح و درصد چشم‌زدگی در تخم‌های تمام ماده (تیمار ۱)، به‌ترتیب ۱±۸۰، ۰/۶±۷۹/۳ در جمعیت مخلوط نر و ماده (کنترل) (تیمار ۲) به‌ترتیب ۱ ±۸۲، ۰/۶±۸۰/۳ و در تیمار ۳ به‌ترتیب ۱ ± ۷۲ و ۰/۶±۷۹/۳ بود که به‌جز درصد لقاح، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($p>0/05$). یافته‌ها حاکی از بهبود کیفیت اسپرم مولدین نر تغییر جنسیت یافته با استفاده از ماده رقیق‌کننده نسبت به استفاده از این ماده در اسپرم ماهیان معمولی است. افزایش شاخص رشد شامل نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۱ به‌ترتیب ۰/۱±۱/۴ و ۰/۱± ۰/۹ و در تیمار ۲ به‌ترتیب ۰/۱± ۱/۳ و ۰/۱± ۱/۱ بود که با هم تفاوت معنی‌داری داشتند ($p<0/05$). استفاده از ماده رقیق‌کننده جهت بهبود بازده تکثیر و عدم نیاز به نگهداری تعداد زیاد مولدین نر در مزارع در راستای تولید بچه ماهی تک جنس، کاملاً مطلوب است.

لغات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، نر تغییر جنسیت یافته، رقیق‌کننده، درصد لقاح

*نویسنده مسئول

مقدمه

کشور ایران به دلیل وجود منابع آب شیرین و شرایط اقلیمی، یکی از مهم‌ترین کشورهای جهان در تولید و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است به‌طوری‌که در سنوات اخیر دارای رتبه نخست در تولید این آبزی بوده است. استان‌های واقع در مناطق غربی کشور از جمله کهگیلویه و بویراحمد، لرستان و چهار محال و بختیاری، بیشترین سهم را در تولید ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در کشور دارند (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۸). دسترسی پرورش‌دهندگان به نهاده‌های تولید ماهی و توسعه فناوری‌های نوین، از مهم‌ترین عوامل تولید و توسعه صنعت پرورش ماهی قزل‌آلا در کشور است. تأمین تخم چشم‌زده تک‌جنس و تمام ماده به دلیل قابلیت تولید ماهیان تک‌جنس ماده دارای مزایای متعددی بوده که چنین محصولاتی از خارج کشور وارد می‌شوند و مشکل تأمین این نهاده‌ها از مهم‌ترین دغدغه‌های پرورش‌دهندگان است. در قزل‌آلای رنگین‌کمان پدیده بلوغ جنسی در جنس نر خیلی زودتر از جنس ماده به‌وقوع می پیوندد و باعث تفاوت رشد ماهیان نر و ماده و عدم یکنواختی اندازه ماهیان پرورشی جهت عرضه به بازار می‌گردد (Bye and Lincolin, 1986). بلوغ جنسی در قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث کاهش رشد بدن می‌شود، زیرا انرژی که باید صرف تولید گوشت شود، به مصرف توسعه گنادها و بروز صفات ثانویه جنسی و رفتارهای تولید مثلی می‌رسد. کاهش کیفیت گوشت و وضعیت ظاهری بر اثر پدیده بلوغ جنسی نیز باعث کاهش ارزش محصول می‌شود (Sheehan *et al*., 1997).

جنس ماده در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مقایسه با جنس نر دارای رشد بیشتر، مقاومت به بیماری بالاتر و بلوغ دیرتر بوده و چنین ویژگی‌هایی سبب ترغیب پرورش‌دهندگان به پرورش جنس ماده از طریق استفاده از تکنیک‌های تغییر جنسیت بچه ماهیان گردیده است (Nagahama *et al*., 2004). استفاده از هورمون‌ها از جمله روش‌های کاربردی جهت تغییر جنسیت است. با توجه به حساسیت استفاده مستقیم از هورمون‌ها در تولید محصولات کشاورزی و دامی و عدم مقبولیت تولید ماهیان تمام ماده از طریق تیمار مستقیم هورمونی، تولید ماهیان تمام ماده به طریق غیر مستقیم به روش تولید ماهیان نر تغییر جنسیت یافته، یکی از راه‌حل‌های کاربردی است (Pandian and Kirankumar, 2008).

هدف اصلی در کنترل جنسیت ماهیان، افزایش سوددهی در مراحل مختلف پرورش است که در کنار سایر تکنولوژی‌های جدید زیستی می‌تواند افزایش تولید را نیز به‌همراه داشته باشد. در بسیاری از گونه‌های ماهیان پرورشی، جنس‌های ماده دارای میزان رشد و اندازه بزرگتری نسبت به جنس نر هستند. علاوه‌براین، در برخی از گونه‌ها، جنس‌های نر قبل از اینکه به اندازه مناسب (وزن بازاری) برسند، بالغ می‌شوند. این دو عامل باعث تفاوت بسیار زیادی در اندازه ماهیان و کاهش میزان تولید می‌گردد. به همین دلیل موسسات خصوصی پرورش ماهی تمایل بسیار زیادی برای تولید جمعیت‌های همسان از ماهیان ماده دارند (Yaron, 1995). بهبود کیفیت مواد تناسلی مولدین و کنترل تولید مثل می‌تواند ما را در دستیابی به تقاضای روزافزون و در حال رشد آبزی‌پروری در جهان کمک کند (Yaron, 1995). اگرچه اغلب مطالعات نشان از کاهش تحرک و قابلیت لقاحی اسپرم آزادماهیان در فاصله چند دقیقه پس از فعال‌سازی با محلول‌های فعال‌کننده نمکی یا مایع سلومیک دارد (Rurangwa *et al*., 2004). مدت‌ها بعد نشان داده شد که میزان یون کلسیم در فعال‌کننده‌ها می‌تواند طول دوران تحرک اسپرم را طولانی‌تر کند (Baynes *et al*., 1981). پارامترهای متفاوتی از قبیل طول مدت زمان تحرک، حرکت موجی‌شکل و غلظت سلول‌های اسپرم، میزان یون‌های موجود در پلاسمای منی و نیز فعال‌کننده‌ها، ترکیبات پلاسمای منی و ... همه از عواملی هستند که می‌توانند کیفیت اسپرم را تحت تاثیر قرار دهند (Rakitin *et al*., 1999). نرهای تغییر جنسیت یافته فاقد مجرای اسپرم‌بر هستند و برای استحصال اسپرم باید مورد جراحی قرار گیرند (Bye and Lincoln, 1986) شایان ذکر است، اسپرمی که به طور مستقیم از بیضه نر ماهیان تغییر جنسیت یافته استحصال می‌شود، برخلاف اسپرم نرهای معمولی تحولاتی مانند تنظیم

ترکیبات یونی مایع سلومیک و تراوش‌های هورمونی را در داخل مجرای اسپرم‌بر طی نمی‌کند.

باشتی و همکاران (۱۳۹۶) برای تولید جمعیت تمام ماده ماهی قزل آلای رنگین کمان به روش غیرمستقیم، لاروهای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را به مدت ۶۰ روز از شروع تغذیه فعال با غذاهای حاوی هورمون ۱۷ آلفا متیل تستوسترون (۰/۵، ۱/۵، ۳، ۶ و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا) تیماربندی کردند. بررسی نتایج نشان‌دهنده موثر بودن هورمون ۱۷ آلفا متیل تستوسترون در تمامی تیمارها بود. در گروه‌های تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵، ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم هورمون در کیلوگرم غذا، ۱۰۰ درصد ماهی نر حاصل شد. بیشترین میزان رشد در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۳ و ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم هورمون در کیلوگرم غذا و نیز تیمار شاهد مشاهده شد. در تمامی موارد که منجر به ایجاد نتاج شدند، جمعیت ۱۰۰ درصد ماده تولید کردند.

در مطالعه جوهری و همکاران (۱۳۸۵) جهت تولید جمعیت تمام ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از نرهای تغییر جنسیت یافته، نتاج حاصل از ترکیب اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته با تخمک ماده‌های معمولی بدون رقیق‌کننده، تماماً ماده بودند. در این مطالعه اختلاف معنی‌داری در بین برخی از شاخص‌های درصد چشم‌زدگی، درصد تخم‌گشایی و درصد بازماندگی لاروهای حاصل از این تلاقی با گروه شاهد به‌دست نیامد.

Cousin-Gerber و همکاران (۱۹۸۹) با استفاده از هورمون متیل تستوسترون با دوزهای ۳-۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا و طی دوره‌های ۶۰ و ۹۰ روزه بعد از شروع تغذیه فعال جمعیت تمام ماده به ۹۷-۸۹ درصد دست یافتند. به طور کلی، پرورش‌دهندگان قزل‌آلا ترجیح می‌دهند، ماهیانی با اندازهٔ بزرگتر تولید کنند تا بتوانند آنها را با قیمت بیشتری بفروشند. تک‌جنس‌سازی به دو روش مستقیم و غیر مستقیم انجام می‌شود. امروزه متداول‌ترین روش ایجاد جمعیت تمام ماده، استفاده از مقادیر کم هورمون‌ها جهت تغییر ژنتیکی ماهیان ماده به ماهیان ماده تغییر جنسیت یافته (نئومیل) و در ادامه تولید نتاج تمام‌ماده از آمیزش این ماهیان نر با ماده‌های معمولی (یا همان روش غیر مستقیم) است (طلا، ۱۳۸۰).

در حال حاضر، علاوه بر تخم‌های چشم‌زده و لاروهای تولید کارگاههای تکثیر داخل کشور، از سایر نقاط جهان مانند دانمارک، نروژ، و فرانسه تخم‌چشم زده وارد کشور می‌شود. یکی از راهکارهای کاهش واردات و اتکاء به تولیدات داخلی، تقویت نظام تکثیر داخلی است. امروزه تولید تخم‌های تک‌جنس با کیفیت در کشور به عنوان ابزاری مهم و کلیدی در صنعت آبزیان سردآبی به‌خصوص گونه مهمی مانند قزل‌آلای رنگین‌کمان محسوب می‌شود که در صورت دستیابی به این مهم، می‌توان با توجه به شرایط تحریم و اهمیت بیوتروریسم، گام مهمی در افزایش توان تولید این صنعت برداشت و از انجام هزینه‌های گزاف نیز جلوگیری نمود (باشتی، ۱۳۹۶). با این‌وجود، در این تحقیق تلاش براین بوده است تا با اجرای طرح‌های پژوهشی، فناوری تولید این محصولات در کشور بهینه شده و زمینه رفع وابستگی به خارج از کشور فراهم گردد.

هدف از انجام این تحقیق بررسی امکان تولید ماهیان تمام ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از نرهای تغییر جنسیت یافته و مقایسه پارامترهای تکثیر آنها و ارزیابی روند افزایش رشد در مقایسه با جمعیت مخلوط نر و ماده تا وزن ۵۰ گرم بود.

مواد و روش‌ها

این پروژه با هدف بررسی شاخص های تکثیر و رشد جمعیت تمام ماده در ماهی قزل آلای رنگین کمان در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی انجام گرفت.

این تحقیق در غالب سه تیمار:

۱- تخمک ماهیان مولد ماده معمولی با میانگین ۴-۳ سال و اسپرم مولدین نر نئومیل (XX) ۲-۳ سال با رقیق کننده اسپرم حاوی ۵۰ میلی مولار پتاسیم برای لقاح استفاده گردید.

۲- تخمک ماهیان مولد ماده معمولی ایرانی با میانگین ۳-۴ سال و اسپرم مولدین نر ایرانی معمولی ۳-۲ سال برای لقاح استفاده گردبد.

۳- تخمک ماهیان مولد ماده معمولی ایرانی با میانگین ۳-۴ سال و اسپرم مولدین نر ایرانی معمولی ۳-۲ سال که با رقیق کننده اسپرم حاوی ۵۰ میلی مولار پتاسیم برای لقاح استفاده گردید.

تعداد ۳۰ مولد نر xx از ماهیان موجود در مرکز پس از معاینه جنسی (از آنجا که مجرای اسپرم‌بر ماهی های تغییر جنسیت یافته اغلب تکامل نیافته و یا وجود ندارد، اسپرمی از این ماهی‌ها به روش معمول استحصال نمی‌شود) آنها جداسازی شد. برای عملیات لقاح، ابتدا استحصال تخمک از ده قطعه مولد ماده (میانگین تخمک هر مولد ماده، ۴۰۰ گرم و تقریبا تعداد ۱۵ عدد تخمک در هر گرم، در نهایت ۶۰ هزار تخمک) صورت گرفت و تخمک‌های مولدین ماده پس از توزین به دلیل یکنواختی کیفیت آنها در یک تشت پلاستیکی با هم مخلوط و برای هر تیمار بیست هزار تخمک و سپس به نه قسمت (هر تیمار ۳ تکرار) مساوی تقسیم شدند. برای برداشت اسپرم از ماهیان نر تغییر جنسیت یافته که فاقد مجرای اسپرم‌بر بودند، پس از بیهوش کردن مولدین، با ایجاد شکافی از ناحیه مخرج تا زیر باله شکمی به‌وسیله اسکالپل، محوطه شکمی باز و سپس بیضه‌ها به آرامی خارج گردید. برای جداسازی اسپرم از بافت بیضه، با استفاده از یک الک با چشمه ۲ میلی‌متر، بیضه‌ها فشار داده شدند و اسپرم رهاسازی شده از بیضه زیر الک جمع گردید (جوهری و همکاران، ۱۳۸۵). ظرف مذکور روی قطعات یخ خرد شده قرار گرفت تا با پایین نگه داشتن دما از هر گونه تغییر در ماهیت اسپرم استحصالی جلوگیری شود. در تمام موارد وزن و طول کل مولدان نر اندازه گیری و ثبت شد (Billard and Gillet, 1981).

با توجه به تحقیقات و آزمایش‌های صورت گرفته مبنی بر غلیظ بودن اسپرم مولدین نر تغییر جنسیت یافته و اینکه مدت زمان تحرک و تراکم اسپرم مولدین نرهای تغییر جنسیت یافته به طور معناداری طولانی‌تر از اسپرم نرهای معمولی هست (Geffen and Evans, 2000) و نظر به کمتر بودن حجم اسپرم و دسترسی کمتر به مولدین تغییر جنسیت یافته، در این پژوهش در تیمار یک از محلول رقیق کننده اسپرم که حاوی ۵۰ میلی مولار کلرید پتاسیم بود، جهت رقیق کردن و افزایش حجم اسپرم به نسبت ۳:۱ (یک حجم اسپرم و ۳ حجم محلول رقیق کننده) مورد استفاده قرارگرفت. ترکیب محلول رقیق کننده شامل سدیم کلراید (۱۰۰ میلی مول)، پتاسیم کلراید (۴۰ میلی مول)، کلسیم کلراید (۱ میلی مول) و تریس (۱۰ میلی مول) بود و محلول دوم محلول فعال‌کننده بود که حاوی کلسیم کلراید (۲ میلی مول)، سدیم کلراید (۵۰ میلی مول) و تریس (۱۰ میلی مول) بود که هر کدام از این محلول‌ها در یک لیتر آب مقطر تهیه شدند و محلول رقیق‌کننده به نسبت یک حجم اسپرم و ۳ حجم رقیق کننده استفاده شد و محلول فعال‌کننده بعد از مخلوط شدن اسپرم و تخمک و فرآیند لقاح به تخم‌ها اضافه شد. حدود ۵ ثانیه بعد از استحصال تخمک و اسپرم و عملیات لقاح با فعال‌کننده مورد نظر، فرآیند شستشوی تخم‌ها صورت گرفت.

غلظت اسپرم

برای شمارش اسپرماتوزوئیدهای جمع‌آوری شده از مولدین، ابتدا آنها رقیق شدند و سپس در لام مخصوص هموسیتومتر و میکروسکوپ فازکنتراست زمینه سیاه، عمل شمارش انجام شده و تراکم اسپرماتوزوئید از طریق رابطه ذیل محاسبه شد (Aas *et al*., 1991)

تراکم اسپرماتوزوئید در یک سانتی‌متر مکعب به صورت خالص= $\mathbf{X}\times۱۰^{۷}\times۵$

$\mathbf{X}$: مجموع اسپرم در ۵ خانه لام هموسیتومتر

اندازه‌گیری طول دوره حرکت اسپرم

از میکروسکوپ متصل به دوربین (فازکنتراست) استفاده شد. بعد از رقیق سازی اسپرم با رقیق کنندها، پارامترهای حرکتی اسپرم بلافاصله (با تأخیر زمانی کمتر از ۷ ثانیه) بعد از شروع فعالیت اسپرم تا زمانی که ۱۰۰ درصد اسپرم‌ها غیر متحرک شدند با میکروسکوپ فازکنتراست

ثبت شدند. مدت زمان حرکت از لحظه ی فعال شدن تا زمانی که همه اسپرم‌ها از حرکت باز می‌ایستند، اندازه‌گیری شدند. همه آزمایش‌ها در سه تکرار و درجه حرارت اتاق (۲۲-۲۰) با میکروسکوپ فازکنتراست و با بزرگنمایی ۱۰ انجام گرفت (Vladi *et al*., 2002).

پس از استحصال تخمک و مخلوط کردن تخمک ها و اسپرم‌ها، حدود ۵ ثانیه بعد به تخم ها جهت تحریک نهایی اسپرم، آب اضافه گردید و در نهایت به منظور حذف اسپرم اضافی تخم‌ها با آب تمیز شسته شده و به منظور سپری کردن زمان مناسب موقتاً در تراف نگهداری شدند. سپس تخم‌ها به صورت مجزا به سینی‌های انکوباسیون منتقل شدند تا ادامه مراحل رشد را در آن‌جا سپری کنند. تیمارهای مذکور در ۳ تکرار انجام گرفت، برای جلوگیری از نور مستقیم بر تراف‌ها از صفحات یونولیتی استفاده گردید.

بررسی شاخص‌های تکثیر

برای جمع آوری و ثبت تلفات تخم‌ها، به صورت دستی تعداد تلفات ۲۴ ساعت بعد از لقاح، تعداد تلفات در زمان چشم‌زدگی، تعداد تلفات چشم‌زدگی تا آغاز تفریخ کامل، تعداد تلفات از اتمام تفریخ تا شنای عمودی و شروع تغذیه فعال، شمرده و ثبت گردید.

تعیین درصد لقاح

۸ روز پس از لقاح به منظور تعیین درصد لقاح در تیمارها حدود ۱۰۰ عدد تخم، پس از شفاف‌سازی به‌وسیله محلول شفاف‌کننده شامل فرمالین ۵ درصد، اسید استیک ۴ درصد، آب مقطر (Bromage and Cumarantaunga, 1998)، مشاهده شدند و نمونه‌های دارای کمربند عصبی مورد شمارش قرار گرفتند. میزان لقاح تخمک‌ها مطابق رابطه ذیل محاسبه و ثبت گردید (Bromage and Cumarantaunga, 1998):

$$\text{درصد لقاح} = \frac{\text{تعداد تخم های لقاح یافته}}{\text{تعداد کل تخم ها}} \times ۱۰۰$$

تعیین میزان چشم‌زدگی

تعیین تخم‌های چشم‌زده از تخم‌های تلف شده با روش شوک‌دهی صورت گرفت (Aas *et al*., 1991) تخم‌ها از فاصله ۲۰ سانتی‌متری در سینی دیگری تخلیه شدند که طی این عمل تخم‌های لقاح نیافته یا تلف‌شده، سفید شدند و تخم‌های تلف‌شده با استفاده از پوار جمع‌آوری شد و مورد شمارش قرار گرفتند. تخم‌های چشم‌زده به‌دقت شمارش شدند و میزان بازماندگی تخم‌ها تا مرحله چشم زدگی از رابطه ذیل محاسبه گردید (Aas *et al*., 1991).

$$\text{درصد چشم‌زدگی} = \frac{\text{تعداد تخم های چشم زده}}{\text{تعداد تخم های لقاح یافته}} \times ۱۰۰$$

درصد تخم‌گشایی

با تفریخ شدن تخم ها و ظهور لارو دارای کیسه‌ی زرده تخم های تفریخ نشده با استفاده از پوار جمع آوری شده و پس از شمارش آنها درصد تخم گشایی از رابطه ذیل بدست آمد (Billard and Gillet, 1981):

$$\text{درصد تفریخ} = \frac{\text{تعداد لارو}}{\text{تعداد تخم چشم زده}} \times ۱۰۰$$

بازماندگی لاروها تا مرحله جذب کیسه زرده (شروع تغذیه فعال)

پس از اینکه دو سوم کیسه زرده لاروها جذب شد، با شمارش لاروهای تلف شده، میزان بازماندگی لارو تا مرحله جذب کیسه زرده محاسبه شد (Billard and Gillet, 1981):

$$\text{درصد بازماندگی لارو در مرحله آغاز تغذیه فعال} = \frac{\text{تعداد لارو های زنده}}{\text{تعداد کل لارو های ذخیره شده}} \times ۱۰۰$$

در مرحله آخر میزان بازماندگی بچه ماهی‌ها تا وزن ۵ گرم، محاسبه و اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی میزان رشد، حدود ۵ هزار قطعه از بچه ماهیان در وزن ۵ گرم جهت کاهش هزینه‌های خوراک جداسازی و به صورت ماهانه، سنجش وزنی و طولی بچه ماهیان تیمارهای مختلف تا وزن ۵۰ گرم انجام گرفت. با این روش، ۱۰ درصد نمونه بچه ماهیان هر تیمار به صورت تصادفی جدا و در عصاره گل میخک بیهوش می‌شدند. سپس طول آنها با خط کش معمولی و وزن با ترازوی با دقت یک‌دهم گرم تعیین گردید. متوسط وزنی و طولی بچه ماهیان هر تکرار محاسبه و ثبت شد. در پایان هر زیست‌سنجی با توجه به میانگین وزنی جدید به‌دست آمده و درجه حرارت آب، میزان غذا جهت ۳۰ روز آینده هر تیمار مشخص شد، شاخص‌های رشد طبق فرمول‌های ذیل محاسبه شد:

SGR=(ln wf-ln wi)×100/t (نرخ رشد ویژه) (Huang *et al*., 2008)

wf: وزن نهایی، wi: وزن اولیه، t: دوره رشد (روز)

$Cf=w/L^3\times100$ (ضریب چاقی) (Grant *et al*., 2008)

W: وزن ماهی (گرم)، L: طول ماهی (سانتی‌متر)

FCR=f/(wf-wi) (Turchini *et al*., 2003)

f: میزان غذای مصرفی، wf: وزن نهایی، wi: وزن اولیه

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جمع‌آوری و پردازش اطلاعات میدانی و آزمایشگاهی با استفاده از نرم افزار Excel و تجزیه وتحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت. قبل از تجزیه‌وتحلیل، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از هر مرحله تحقیق و آزمایش‌های مختلف با استفاده از برنامه آماری SPSS (آنالیز واریانس ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح اعتماد ۰/۰۵ درصد استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از آزمون کولموگروف اسمیرنف نشان داد که داده‌ها با اطمینان ۹۵ درصد نرمال بودند ($p>0/05$). میانگین دمای آب کارگاه در طول دوره انکوباسیون و پرورش ۱۱±۰/۵ درجه سانتی‌گراد بود. نتایج حاصل از مراحل انکوباسیون در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: مقایسه میانگین و انحراف معیار برخی شاخص های تولیدمثلی قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف

Table 1: Comparison of mean and standard deviation of some reproductive indices of rainbow trout in different treatments

گروه‌های آزمایشی شاخص های کمی کیفی	تیمار (۱) تک جنس تمام ماده رقیق شده	تیمار (۲) معمولی	تیمار (۳) معمولی رقیق شده
لقاح (درصد)	۸۰±۱^{b}	۸۲±۱^{c}	۷۲±۱^{a}
چشم زدگی (درصد)	۷۹/۳±۰/۶^{a}	۸۰/۳±۰/۶^{a}	۷۹/۳±۰/۶^{a}
تخم گشایی (درصد)	۸۰±۱^{b}	۸۰/۳±۰/۶^{b}	۷۸±۱^{a}
غلظت اسپرم ($cell\times10^{9}$ ml)	۷/۱±۰/۳^{c}	۵/۲±۰/۵^{b}	۴±۱^{a}
زمان تحرک (ثانیه)	۳۶/۳±۱/۵^{c}	۳۱ ±۱^{b}	۲۳/۳±۲^{a}

بیشترین مقدارc کمترین مقدار و حرف a حرف .)>pحروف غیرهمسان در هر سطر نشانه اختلاف معنی‌دار است (۰/۰۵

درصد لقاح در تیمار شماره دوم (معمولی) از سایر تیمارها بالاتر بود و با سایر تیمارها از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). درصد چشم‌زدگی تخم‌های حاصل از اسپرم‌های نرهای تغییر جنسیت یافته نسبت به اسپرم نرهای معمولی از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵). درصد تخم‌گشایی، غلظت اسپرم و مدت زمان تحرک بین گروه‌های آزمایشی، تفاوت معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵).

در جدول ۲ نتایج حاصل از مقایسه میانگین شاخص‌های رشد ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان نسبت به لقاح حاصل از تلاقی ماهیان قزل آلای رنگین کمان نر **xx** ایرانی و ماده نژاد ایرانی در پایان دوره ارائه شده است. بیشترین میزان نرخ رشد ویژه (۱/۴±۰/۱) در تیمار یک (تک جنس تمام ماده) بود که با گروه شاهد (۱/۳ ±۰/۲) اختلاف معناداری داشت (p<۰/۰۵).

کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی در تیمار یک (تک جنس تمام ماده) مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). در نتایج حاصل از ضریب چاقی بین تیمارها، اختلاف معناداری به‌دست نیامد (p>۰/۰۵).

جدول ۲: مقایسه میانگین و انحراف معیار برخی شاخص های رشد ماهیان قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف

Table 1: Comparison of mean and standard deviation of some growth indices of rainbow trout in different treatments

گروه‌های آزمایشی شاخص های رشد	تیمار (۱) تک جنس تمام ماده رقیق شده	تیمار (۲) معمولی	تیمار (۳) معمولی رقیق شده
بازماندگی لارو تا تغذیه فعال	۹۴/۶±۱/۱^{a}	۹۴±۱^{a}	۹۳/۳±۰/۶^{a}
نرخ رشد ویژه	۱/۴±۰/۱ ^{b}	۱/۳ ±۰/۱ ^{a}	۱/۳ ±۰/۱ ^{a}
ضریب تبدیل غذایی	۰/۹ ±۰/۱^{a}	۱/۱ ±۰/۱ ^{ab}	۱/۱±۰/۱^{b}
ضریب چاقی	۱/۲±۰/۱^{a}	۱/۱ ±۰/۱^{a}	۱/۱ ± ۰/۱^{a}

حروف غیرهمسان در هر سطر نشانه اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵). حرف a کمترین مقدار و حرف c بیشترین مقدار

بحث

در سال‌های اخیر نیاز به پرورش ماهی تک‌جنس ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان جهت عرضه به بازار افزایش یافته است. پرورش تک‌جنس ماهیان دارای اهمیت اقتصادی است و به دلایل مختلف از جمله، رشد بیشتر در برخی جنس‌های نر یا ماده ماهیان، جلوگیری از افت بازارپسندی ناشی از ظهور نشانه‌های جنسی، جلوگیری از کاهش کیفیت گوشت ناشی از فرایند بلوغ، پرورش جنس‌های با کیفیت گوشت بالاتر (جنس ماده)، جلوگیری از تفاوت اندازه ناشی از تفاوت رشد جنس‌های نر و ماده در جمعیت ماهیان پرورشی (کاهش تولید)، یکسان‌سازی سایز در صید، کنترل اتلاف انرژی از طریق مواد تناسلی طی فرایند بلوغ زودرس جنس نر (ماهی قزل‌آلای نر یک سال زودتر از ماهی ماده بالغ می‌گردد)، افزایش حساسیت جنس نر نسبت به عوامل بیماری‌زا هنگام بلوغ، حذف رفتار تهاجمی و مزاحمت‌های ناشی از حضور جنس مخالف، جنس ماده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از نظر ویژگی‌های مذکور برتر بوده و ۹۰ درصد ماهیان پرورشی قزل‌آلا در کشورهای پیشرفته از جنس ماده این ماهی بوده و در کشور، افزایش تقاضا برای پرورش این ماهیان به دلیل مزیت رشد بیشتر نسبت به ماهیان بومی بوده است (Nagahama *et al.*, 2004) به‌طوری‌که در تحقیق اخیر، ماهیان حاصله از لقاح تخم‌های ماهی ماده با اسپرم نر نئومیل، ماهیان تمام ماده از رشد بهتر و بیشتری نسبت به تیمار کنترل برخوردار بود. بین جمعیت تمام ماده و جمعیت نر و ماده از لحاظ طی مراحل انکوباسیون تفاوت معنی‌داری مشاهده شد و در این خصوص پایین بودن درصد لقاح اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته در مقایسه با نرهای معمولی در بعضی

مطالعات گزارش شده است (Geffen and Evans, 2000). سایر مطالعات نیز نشان می دهد که اگر برای لقاح تخمک‌ها از مخلوط اسپرم چند مولد نر تغییر جنسیت یافته و به میزان حجم کافی استفاده شود، درصد لقاح به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش خواهد یافت. این میزان می‌تواند برابر یا گاهی بیشتر از درصد لقاح نرهای معمولی باشد (جوهری و همکاران، ۱۳۸۲). در مطالعه اخیر نیز از مخلوط اسپرم ۴ مولد نر تغییر جنسیت یافته برای لقاح یک سوم تخمک‌های ده مولد ماده استفاده گردید. لذا، میزان لقاح و به دنبال آن درصد چشم‌زدگی بالایی مشاهده شد.

در فصل تولید مثل، اسپرماتوزوآی نرهای معمولی در مجرای اسپرم‌بر نگهداری می‌شود درحالی‌که در نرهای تغییر جنسیت یافته به علت نبود این مجرا، اسپرماتوزوآ در داخل بیضه باقی می‌ماند. بنابراین، در این مطالعه مشاهده می‌شود، میزان غلظت اسپرم نرهای معمولی که با فشار ناحیه شکمی خارج شده بود، در مقایسه با اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته که با جراحی خارج شده بودند، به طور معناداری پایین‌تر بود. نتایج یک تحقیق نشان داد که تراکم اسپرم‌های تغییر جنسیت یافته به طور معناداری از تراکم اسپرم‌های نرهای معمولی که با فشار ناحیه شکمی خارج شد، بالاتر بود. بالا بودن تراکم و غلظت اسپرم در اسپرمی که به طور مستقیم از بیضه برداشت می‌شود، در مقایسه با اسپرمی که با فشار ناحیه شکمی خارج می‌شود، می‌تواند به این علت باشد که در حالت برداشت مستقیم از بیضه، اسپرم فاقد مایع منی است یا مقدار تراوشات آن بسیار کم است درحالی‌که اسپرمی که با فشار ناحیه شکمی خارج می‌شود، با تراواشات مایع منی مخلوط است. بنابراین، تراکم کمتری نیز دارد (Geffen and Evans, 2000). زمان تحرک اسپرم‌های نر تغییر جنسیت یافته از اسپرم نرهای معمولی بالاتر بود. در نرهای معمولی اسپرماتوزوآ پس از تکامل و رسیدن به بلوغ وارد مجرای اسپرم‌بر می‌شود و در داخل بیضه مراحل جدید اسپرماتوژنز 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 اسپرماتوزوآی بالغ در داخل بیضه باقی می‌ماند. Geffen و Evans (۲۰۰۰) دریافتند که مدت زمان تحرک اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته به طور معناداری طولانی‌تر از اسپرم نرهای معمولی بود. در این مطالعه درصد چشم‌زدگی تخم‌ها که به عنوان معیاری برای سنجش درصد لقاح استفاده شد، بین سه تیمار مورد بررسی، اختلاف معناداری نداشت. آنها نشان دادند که درصد لقاح اسپرم استحصالی از نر معمولی نسبت به اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته به طور معناداری بالاتر بود که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد.

بررسی عوامل رشد نشان داد که بین گروه‌ها در میزان ضریب چاقی تفاوت معنی‌دار وجود ندارد و در شاخص نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی بین گروه‌ها، تفاوت معنی‌دار بود. هر چند تفاوت‌های رشد بین ماهیان نر و ماده زمانی مشخص می‌شود که نرها در سنین پایین بالغ شوند و انرژی خود را به جای رشد صرف تولید مثل نمایند درحالی‌که ماده‌ها هنوز به رشد خود ادامه می‌دهند. مطالعه حاضر تن‌ها به منظور مشخص نمودن تفاوت‌های احتمالی در میزان رشد پیش از بلوغ در جمعیت‌های تمام‌ماده و مخلوط نر و ماده انجام شد و ادامه بررسی رشد این ماهیان می‌تواند مشخص‌کننده اثر جنسیت و پدیده بلوغ در میزان رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان باشد به‌طوری‌که Sheehan و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که رشد ماهیان ماده قزل‌آلا زمانی که به وزن حدود ۲۰۰-۱۵۰ گرم می‌رسند، از ماهیان نر بیشتر است. میزان بازماندگی ماهیان از زمان شروع تغذیه فعال تا پایان دوره بررسی (۱۸۰ روز)، بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نشان نداد که با نتایج مطالعات Sheehan و همکاران (۱۹۹۷) هم‌خوانی دارد.

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 است. بنابراین، استفاده از این ماهیان برای تولید جمعیت تمام ماده توصیه می‌شود. همچنین استفاده از محلول‌های رقیق‌کننده و تقویت‌کننده اسپرم برای افزایش کیفیت اسپرم استحصالی از ماهیان تغییر جنسیت یافته پیشنهاد

می‌شود و استفاده از ماده رقیق‌کننده جهت بهبود بازده تکثیر و عدم نیاز به نگهداری تعداد زیاد مولدین نر در مزارع در راستای تولید بچه ماهی تک‌جنس کاملاً مطلوب است. در نهایت، بررسی ادامه روند رشد در ماهیان تمام ماده نسبت به جمعیت‌های مخلوط نر و ماده به منظور تعیین دقیق اختلافات رشد بین ماهیان نر و ماده در سنین بالاتر لازم است تا بتوان به توجیه اقتصادی این‌کار دست یافت.

تشکر و قدردانی

از ریاست و کارشناسان محترم مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج به دلیل فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و مشارکت‌های فکری و فنی سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

باشتی، ط.، شریفیان، م.، حسین زاده صحافی، ه.، نیکبخت، م.، ضرغام، د.، کمائی، ک.، صلاحی، م.م.، رزمی، ک.، عبدالحی، ح.، مرادیان، س.ح.، گندمکار، ح.، گرجی پور، ع.، راستیان نسب، ا.، حسینی، ا.، محمد پور، م.، ۱۳۹۶. تولید جمعیت تمام ماده ماهی قزل آلای رنگین کمان به روش غیر مستقیم. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی. مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ۳۵ صفحه.

جوهری، س. ع.، کلباسی، م.، ویلکی، ا.س. و طلا. م.، ۱۳۸۲. مقایسه خصوصیات و قابلیت لقاح اسپرم در ماهیان نر تغییر جنسیت یافته و مولدان معمولی قزل آلای رنگین کمان. مجله علوم دریایی ایران، ۲(۴): ۳۷-۲۷.

جوهری، س.، کلباسی، م.، مجازی امیری، ب. و حلاجیان، ع.، ۱۳۸۵. تولید جمعیت تمام قزل آلای رنگین کمان با استفاده از نرهای تغییر جنسیت یافته و بررسی پارامترهای رشد در سال اول پرورش. مجله علمی شیلات ایران، ۱۵(۵): ۵۴-۴۵.

سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۸-۱۳۹۳. معاونت برنامه ریزی و توسعه مدیریت. دفتر برنامه و بودجه سازمان شیلات ایران، ۶۰ صفحه.

طلا، م.، ۱۳۸۰. بهینه سازی تیمار هورمونی ۱۷ الفا- متیل تستوسترون برای ایجاد تغییرجنسیت و عقیمی در قزل آلای رنگین کمان. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.۲۴۰ صفحه.

Aas, G.H., Refstie, T. and Gjerde, B., 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 95: 125-132. Doi: 10.1016/0044-8486(91)90079

Baynes, SW., Scott, A.P. and Dawson, A.P., 1981. Rainbow trout, Salmo gairdnerii Richarson, Spermatozoa; Effect of pH on motility. *Journal of Fish Biology*, 19: 259-267. Doi: 10.1111/j.1095-8649.1981.

Billard, R. and Gillet, C., 1981. Ageing of Eggs and Temperature Potentialization of Micropolluant Effects of the Aquaculturetic Medium on Trout Gametes. *Cahier du Laboratoire de Montereau*, 12: 35–42.

Bromage, N. and Cumaranatunga, R., 1988. Egg production in the rainbow trout, Recent advances in aquaculture. Blackwell Science, Oxford, , UK. pp 63-139

Bye, V.J. and Lincoln, R.F., 1986. commercial methods for control sexual maturation in rainbow trout. *Aquaculture*, 57(1-4), 299-309. Doi: 10.1016/0044-8486(86)90208-5

Cousin-Gerber, M., Burger, G., Boisseau, C. and Chevassus, B., 1989. Effect of methyltestosterone on sex differentiation and gonad morphogenesis in rainbow trout,

Oncorhynchus mykiss. Journal of Aquatic. *Living Resources*, 2: 225-230. Doi: 10.1051/ALR:1989027.

Geffen A.J. and Evans J.P., 2000. Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout; *Aquaculture*, 182(1): 61-72. Doi: 10.1016/S0044-8486(99)00248-3.

Grant, A.A.M., Baker, D., Higgs, D.A., Brauner, C.J., Richards, J.G., Balfry, S.K. and Schulte, P.M., 2008. Effects of dietary canola oil level on growth, fatty acid composition and osmoregulatory ability of juvenile fall Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 277(3-4):303-312 2008. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.02.032.

Huang S.S.Y., Fu, C.H.L., Higgs, D.A., Balfry, S.K., Schulte, P.M. and Brauner, C.J., 2008. Effects of dietary canola oil level on growth performance, fatty acid composition and ionoregulatory development of spring Chinook salmon parr, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Aquaculture*, 274(1):109-117. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.11.011.

Nagahama, Y., Kobayashi, T. and Matsuda, M., 2004. Sex determination, gonadal sex differentiation and sex change in fish. Tanpakushitsu Kakusan Koso 49(2):116–123. PMID: 14969102.

Pandian, T.J. and Kirankumar, S., 2008. Recent Advances in Hormonal Induction of Sex-Reversal in Fish. *Journal of Applied Aquaculture*, 13(1-4): 205-230. Doi: 10.1300/J028v13n03_02.

Rakitin, A., Ferguson, M. and Trippel, E., 1999. Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic Cod (*Gadus morhua*); Correlation and variation during the spawning season. *Aquaculture* 170(3-4) 349-358. Doi: 10.1016/S0044-8486(98)00417-7.

Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F. and Nash, J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234(1-4) 1-28. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.12.006.

Sheehan, R.J., Shasteen, S.P., Suresh, A.V., Kapuscinski, A.R. and Seeb, J.E., 1997. Better growth in all-female diploid and triploid rainbow trout Transaction of the American Fisheries Society. 128(3), 491-498. Doi: 10.1577/1548-8659(1999)128<0491:BGIAFD>2.0.CO;2.

Turchini, G. M., Mentasti, T., Frøyland, L., Orban, E., Caprino, F., Moretti, V.M. and Valfr´e, F., 2003. Effects of alternative dietary lipid sources on performance, tissue chemical composition, mitochondrial fatty acid oxidation capabilities and sensory characteristics in brown trout (*Salmo trutta L*). *Aquaculture* 225(1-4): 251–267. Doi: 10.1016/S0044-8486(03)00294-1.

Vladi, T.V., Afzelius, B.A. and Bronnikov, G.E., 2002. Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories. Biology of Reproduction, 66(1): 98-105. Doi: 10.1095/biolreprod66.1.98.

Yaron, Z., 1995. Endocrine control of gamesomeness and spawning induction in the carp. *Aquaculture* 129(1-4): 49-73.

Effect of sperm diluent on some reproduction indices resulting from the crossing of sex reversed male (xx) and normal male fish with female rainbow trout

Kazemi E.[1*]; Rastiannasab A.[1]; Hosseini S.A.[1]; Mahdavi Jahanabad J.[1]; Falahat E.[1]

*Esmaeil.kazemi.1986@gmail.com

1-Shahid Motahary Cold water Fishes Genetic and breeding Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Yasoj, Iran.

Abstract

Despite the importance of monosex fry production, due to incomplete gonad development in sex reversed male rainbow trout and the absence of sperm tubes, the use of diluents is necessary to improve sperm quality. In this study, in order to investigate the effect of sperm diluent on some reproduction indices, the results of experimental treatments: including (1) fertilization of diluted sperm of in sex reversed male fish with normal egg (2) fertilization of normal male sperm with normal egg and (3) fertilization of diluted normal sperm with normal egg were compared. According to the results of this study, the percentage of fertilization and eyed egg in the all-female eggs (treatment 1) were 80±1 and 79.3±0.6 respectively. Those indices in the mixed male and female population (control treatment, 2) were , 82±1. 80.3±0.6 and in treatment 3 were 72±1 and 79.3±0.6, respectively. Except for the percentage of fertilization, there were no significant differences for the other studied characteristic ($P>0.05$). The findings indicate an improvement in the quality of the sperm of sex reversed males using a diluent compared to the use of this substance in normal fish sperm. Increase in growth index, including specific growth rate and food conversion ratio in treatment 1 and 2 were 1.4±0.1, 0.9±0.1, and 1.3±0.1, 1.1±0.1, respectively and had a significant difference ($P<0.05$). The use of diluents to improve reproduction efficiency and no need to have a large number of male breeders in the farms in order to produce monosex fry, is completely desirable.

Keywords: Rainbow trout, Sex reversed male, Diluent, Fertilization percentage

*Corresponding author