در
امور دام و آبزیان شماره ۸۰ پاییز ۱۳۸۷
پژوهش و سازندگی

تاثیر رقیق کننده در نسبت های مختلف همراه با آنتی بیوتیک بر روی نگهداری کوتاه مدت و حرکت اسپرم در منی ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris* Lovetzky1828)

• **فردین شالویی**
دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات
• **علی شعبانی**
دانشجوی کارشناسی ارشد منابع طبیعی گرگان
• **محمدرضا ایمانپور**
دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات
• **پریا اکبری**
استادیار گروه شیلات
• **مریم باغفلکی**
استادیار گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: اردیبهشت ماه ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۶
Email: shaluei@yahoo.com

چکیده

نگهداری کوتاه مدت اسپرم ماهی شیپ *Acipenser nudiventris* Lovetzky1828، تاثیر محلول رقیق کننده با ۸ نسبت رقیق سازی، ۵ غلظت آنتی بیوتیک (پنی سیلین+ استروپتومایسین) روی طول دوره حرکت اسپرم مورد مطالعه قرار گرفت. اسپرم (۳ نمونه) در نسبت های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵ و ۴ با محلول رقیق کننده مخلوط شد. برای جلوگیری از رشد باکتری ۵۰۰۰ واحد بین المللی پنی سیلین همراه ۵ میلی گرم استروپتومایسین و (۴۰۰۰+۴، ۳۰۰۰+۳، ۲۰۰۰+۲، ۱۰۰۰+۱ و ۰) به آن اضافه شد. نمونه های اسپرم نگهداری شده در یخچال در ۱، ۳، ۹، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز بعد از جمع آوری از لحاظ طول دوره حرکت بررسی شدند. محلول رقیق کننده به صورت معنی داری باعث طولانی شدن حرکت اسپرم، پس از ۲۱ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد شد ($p<0/05$). اسپرم ماهی شیپ بعد از ۶ ساعت در دمای آزمایشگاه (۲۳-۲۰ درجه سانتی گراد) حرکت خود را از دست داد. اسپرم های رقیق نشده ماهی شیپ در طی ۵ روز حرکت خود را در یخچال (۴ درجه سانتی گراد) از دست دادند. در این تحقیق اختلاف معنی داری در طول مدت حرکت اسپرم در نسبت های مختلف رقیق سازی مشاهده شد ($p<0/01$). در طی نگهداری اسپرم بیشترین و کمترین طول دوره حرکت به ترتیب در نسبت های ۱:۱ و ۱:۴ مشاهده شد. طول دوره حرکت در سطوح مختلف آنتی بیوتیک در طی ۱ و ۳ روز بعد از نگهداری سمن در ۴ درجه سانتی گراد مشابه هم بود ($p>0/05$) ولی در بقیه روزها اختلاف معنی داری مشاهده شد ($p<0/05$). نتایج تحقیق نشان می دهد که استفاده از رقیق کننده در نسبت ۱:۱ و آنتی بیوتیک در غلظت پایین (۱۰۰۰+۱ و۲۰۰۰+۲) حیات اسپرم ماهی شیپ را در طی نگهداری کوتاه مدت افزایش می دهد.

کلمات کلیدی: ماهی شیپ، رقیق کننده، آنتی بیوتیک، نگهداری کوتاه مدت و دریای خزر

Pajouhesh & Sazandegi No 80 pp: 126 - 132

The Influence of extender solution in different dilution ratios accompanying antibiotic on short-term storage and sperm motility of ship sturgeon (*Acipenser nudiventris* Lovetzky, 1828) semen

By: F.Shaluei, Ms.c Student of Fisheries. Gorgan University Shabani, A and Imanpour M.R. Natural Resources and Agricultural Faculty of Baghflaki M. and Akbari P. Faculty Members of Natural Resources and Agricultural Faculty of Gorgan University.

The short-term storage of the endangered ship sturgeon (*Acipenser nudiventris*) semen and effect of extender solution in 8 dilution ratios,5 concentrations antibiotics (penicillin and streptomycin) on motility duration spermatozoa were studied.The fresh semen (n=3) was mixed with extender solution at a 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 and 4 ratios.For preventing bacterial growth, 5000 units of penicillin + 5mg streptomycin/ml, (4000+4, 3000+3, 2000+2, 1000+1 and 0) were added to the stored semen.Samples of stored semen (in the refrigerator) were analyzed for sperm motility at 1, 3, 9, 14, 21, and 28 day after collection. The extender solution significantly($p<0.05$) prolonged the sperm motility for up 21 day at 4°C. Sperm motility from Ship Sturgeon deteriorated within 6 hours after collection when stored at lab temperature (20-22 °C). Undiluted semen from this specis lost its viability within 5 day of storage in the refrigerator. In this study,significant difference is observed in the motility duration between dilution ratio ($p<0.01$). During semen storage, maximal and minimal motility duration were observed in 1:1 and 1:4 dilution rates respectively. The motility duration was similar in all antibiotic concentrations at 1 and 3 day after semen storage in 4°c ($p>0.05$) but significant different was observed at other days($p<0.05$).Results finally indicated that use the extender solution in 1:1 dilution ratio and use of antibiotic in low concentration(1000Iu P+1mg S and 2000IU P+2mg S) prolonged the spermatozoa viability in short-term storage of Ship Sturgeon semen.

Key words: *Acipenser nudiventris*; Extender solution; Antibiotic; Short-Term Storage , Caspain Sea

مقدمه

در آب های سـر تا سر جهان حدود ۲۷۰۰۰ گونه ماهی شناسایی شده کـه در بین آنها ۲۷ گونـه از ماهیان خاویاری از نظـر ارزش اقتصادی جزء گرانتریـن و با ارزش ترین آنها محسـوب می گردنـد و منحصراً در نیمکره شـمالی زیسـت می کنند (۶). شش گونه از ماهیان فوق در آب های دریای خزر و رودخانه های منتهی به آن وجود دارد که در مجموع ۹۰ درصد از کل ذخائر ماهیان خاویاری جهان را تشـکیل می دهند (۶). اتحادیه بین المللی حفاظـت از طبیعت و منابع طبیعـی (۱۹۹۶. IUCN[1]) اعلام کرد که تمام جمعیت های ماهی شـیپ در دریایی آرال از بین رفته و جمعیت های این گونه در دریای سیاه و دریاچه خزر در معرض خطر انقراض می باشد همچنین جمعیت های موجود در رودخانه دانوب در حال از بین رفتن می باشد (۱۵). بدسـت آوردن و فراگیری دانش جدید در مورد جنبه های مختلف بیولوژی منی و نگهداری آن از فاکتورهای مهم کنترل کننده پروسـه لقاح مصنوعی در ماهیـان پرورشـی و حفاظـت بیولوژیـک در گونه های دیگـر جانوری، می باشـد (۵). روش های نگهداری اسپرم عبارتند از: نگهداری کوتاه مدت[2] و انجماد اسپرم[3] (۴). زمانی که اسپرم در دمای پایین (حدود۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شـود اسپرماتوزوآ متابولیسم پایینی داشته و می توان اسپرم را در رقیـق کننده ها[4] بدون تغییـر در کیفیت آن در دوره های کوتاه مدت نگهداری کرد (۱۳). نگهداری اسـپرم در این شـرایط برای دوره های زمانی طولانـی می تواند روی بقا و حرکت اسـپرم بواسـطه آلودگـی میکروبی و شـرایط بدون اکسیژن تاثیر منفی داشته باشد (۱۳). در روش انجماد اسپرم اسـپرماتوزوآ ماهی را می توان در نیتروژن مایع در دوره های زمانی طولانی مدت نگهداری کرد (۱۳). انجماد اسـپرم به عنوان یک استراتژی موثر برای نگهداری از گونه های در معرض انقراض بوسـیله تسهیل در نگهداری گامت در بانک های ژن مطرح شـده اسـت(۸). اسـتفاده از رقیق کننده ها برای تأمیـن انرژی، محافظت اسـپرم از مواد متابولیکـی، تغییرات درجه حرارت و افزایـش طول عمر اسـپرم می باشـد. خواص یک رقیـق کننده خوب را مـی توان دارا بـودن غلظت یکسـان، ظرفیت تامپونی خـوب، تهیه انرژی، خاصیت ضد باکتریایی، آنتی اکسیدان، کیفیت نگهداری خوب، تامین فشار اسـمزی مناسب، تعادل الکترولیت ها، افزایش دهنده حجم اسپرم، حفاظت از شوک سرمایی و مقرون به صرفه بودن و آسانی تهیه آن نام برد (۲). یکی از مشـکلات بـزرگ در تکثیر ماهیان خاویاری هم بـرای اهداف حفاظتی و هم برای تکثیر تجاری عدم صید همزمان ماهیان مولد نر و ماده می باشـد همچنین ماهیان خاویاری بعد از صید شرایط بهینه تکثیر خود را به سرعت از دست می دهند علاوه بر این جمعیت های که به صورت پرورشی نگهداری می شوند به سختی در یک زمان آماده تکثیر می شوند. در نتیجه استفاده از رقیق کننده ها می تواند کمک بزرگی برای عملیات تفریخگاه ها باشـد (۹). با توجه به این که ماهی شـیپ یک گونه در حال انقراض می باشـد مطالعه در مورد بیولوژی اسـپرم، نگهداری کوتاه مدت و بلند مدت اسپرم این گونه می تواند در احیا جمعیت این گونه موثر باشد.

مواد و روش کار

محل نمونه برداری و نمونه های اسپرم

مولدین شیپ (با طول کل ۱۴۶-۱۰۲ سانتیمتر و وزن ۱۹/۴ -۱۵/۷ کیلوگرم) بعد از صید در سواحل جنوب شرقی دریای خزر به مرکز تکثیر ماهیان خاویاری شهید مرجانی منتقل گردیدند. نمونه ها در طی ماه های اسفند تا اردیبهشت سال های ۸۵-۱۳۸۴ جمع آوری شدند. اسپرم ها با دقت بدون اینکه به آب، ادرار و یا خون آلوده شوند، جمع آوری شدند. بعد از اطمینان از فعال بودن آنها، نمونه ها در سرنگ های استریل قرار داده شدند و جهت انجام آزمایشات مربوطه به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردیدند(۳). ۳ نمونه اسپرم را در حجم یکسان (۳ میلی لیتر از هر نمونه) با هم مخلوط کرده و برای رقیق سازی از این اسپرم[5] مخلوط استفاده شد (۱۶).

آماده کردن تیمارها

رقیق کننده مورد استفاده در این تحقیق (با ترکیبات مندرج در جدول ۱) بر اساس رقیق کننده ای که برای نگهداری اسپرم ماهیان خاویاری گسترش یافته، ساخته شد (۹).

جدول شماره ۱: ترکیب محلول رقیق کننده برای افزایش طول دوره حرکت اسپرم ماهیان خاویاری

ردیف	ماده شیمیایی	غلظت gr/lit
۱	کلرید سدیم	۰/۱
۲	کلرید پتاسیم	۰/۲
۳	بی کربنات سدیم	۰/۵
۴	کلرید کلسیم	۰/۰۵
۵	سولفات منیزیم	۰/۰۵
۶	فسفات سدیم مونو بیسیک	۰/۱۵
۷	فسفات سدیم دی بیسیک	۰/۱۵
۸	گلوکز	۹

pH محلول فوق با استفاده از هیدروکسید سدیم و کلرید پتاسیم در محدوده ۷/۵-۷/۳ تنظیم شد در این حالت فشار اسمزی محلول فوق باید ۱۰۰ میلی اسمول در کیلوگرم (Osmometer،robling Germany) باشد (۹). مخلوط آنتی بیوتیک پنی سیلین همراه استروپتومایسین (تولیدی شرکت داروسازی جابر بن حیان، تهران) با محلول نگهدارنده در دوزهای ۵۰۰۰ IU + ۵ mg، ۴۰۰۰ IU +۴ mg، ۳۰۰۰ IU +۳ mg، ۲۰۰۰ IU +۲ mg و ۱۰۰۰ IU +۱ mg و بدون آنتی بیوتیک آماده شدند (۷) و در نسبت های ۳،۴/۲،۳،۵/۱،۲،۵/۰،۱،۵/۵ با اسپرم مخلوط گردیدند و درون ویال های ۱/۵ میلی لیتر در یخچال نگهداری شدند.

اندازه گیری حرکت اسپرم

طول دوره حرکت تیمارهای آماده شده در طی ۱، ۳، ۹، ۱۴، ۲۱و ۲۸ روز بعد از نگهداری در یخچال، با ۳ تکرار برای هر تیمار اندازه گیری شد (۹).برای اندازه گیری طول دوره حرکت در تیمارهای مختاف ۱۰ میکرو لیتر از نمونه ها روی لام قرارداده و برای شروع حرکت، ۱ میلی لیتر آب مقطر به آنها اضافه شد (۹). طول دوره حرکت اسپرم ها تا زمانی که تقریباً ۱۰ درصد اسپرمها دارای حرکت رو به جلو بودند بوسیله استرئومیکروسکوپ (میکروسکوپ متصل به دوربین) و در دمای اتاق (۲۳-۲۰) درجه سانتیگراد اندازه گیری شد (۹).

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش به صورت فاکتوریل ۸×۶ (۶ سطح آنتی بیوتیک و ۸ نسبت رقیق سازی) در غالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ توسط نرم افزار SAS در محیط ویندوز XP صورت گرفت. نمودارهای مربوطه با استفاده از برنامه EXCEL در محیط ویندوز ترسیم شدند.

نتایج

تاثیر نسبت های مختلف رقیق سازی همراه با سطوح مختلف آنتی بیوتیک روی طول دوره حرکت اسپرم، روز اول

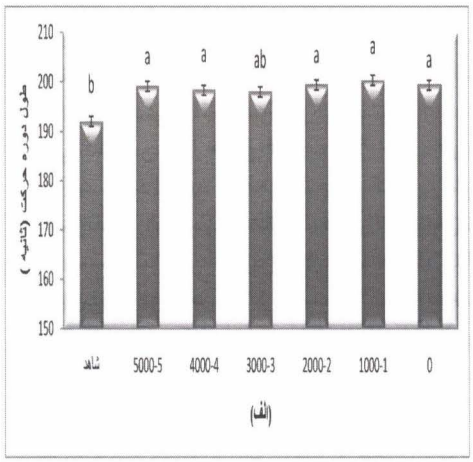
در روز اول نگهداری اسپرم تاثیر نسبت های مختلف رقیق سازی روی طول دوره حرکت اسپرم معنی دار بود ($p<0/01$) ولی اثر سطوح مختلف آنتی بیوتیک معنی دار نبود($p>0/05$). طول دوره حرکت اسپرم در نسبت رقیق سازی ۱:۱ دارای بیشترین طول دوره حرکت بود (۲۳۴/۵±۲/۲ s) و با افزایش نسبت رقیق سازی طول دوره حرکت اسپرم کاهش یافت (نمودار۱). میانگین طول دوره حرکت اسپرم بدون رقیق سازی (تیمار شاهد) در دمای ۴ درجه سانتی گراد، ۱۹۲±۶ ثانیه بود. اسپرم نگهداری شده در دمای آزمایشگاه (۲۳-۲۰ درجه سانتی گراد) حرکت خود را بعد از ۶ ساعت از دست داد.

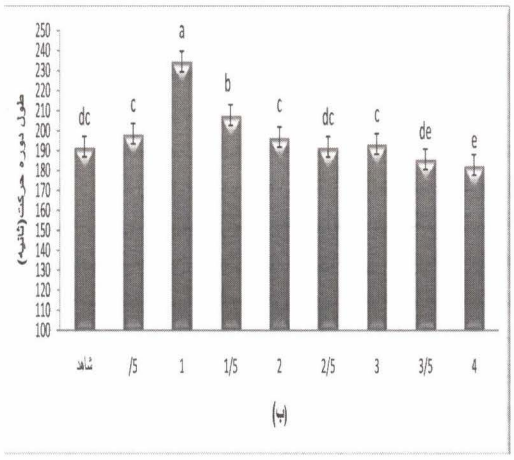
تاثیر نسبت های مختلف رقیق سازی همراه با سطوح مختلف آنتی بیوتیک روی طول دوره حرکت اسپرم، روز سوم

در روز سوم نیز اختلاف معنی داری بین تاثیر نسبت های مختلف رقیق سازی و طول دوره حرکت اسپرم مشاهده شد ($p<0/01$) ولی اثر سطوح مختلف آنتی بیوتیک معنی دار نبود ($p>0/05$). بیشترین طول دوره حرکت اسپرم در نسبتهای مختلف رقیق کننده مربوط به نسبت ۱:۱ دیده شد (۲۰۴/۴±۱/۵۸) و با افزایش نسبت رقیق سازی طول دوره حرکت اسپرم به صورت معنی داری کاهش یافت (نمودار۲). متوسط طول دوره حرکت اسپرم بدون رقیق کننده و آنتی بیوتیک در دمای یخچال (تیمار شاهد) در این روز ۱۱۱±۶/۵۵ ثانیه بود.

تاثیر نسبت های مختلف رقیق سازی همراه با سطوح مختلف آنتی بیوتیک روی طول دوره حرکت اسپرم، روز نهم

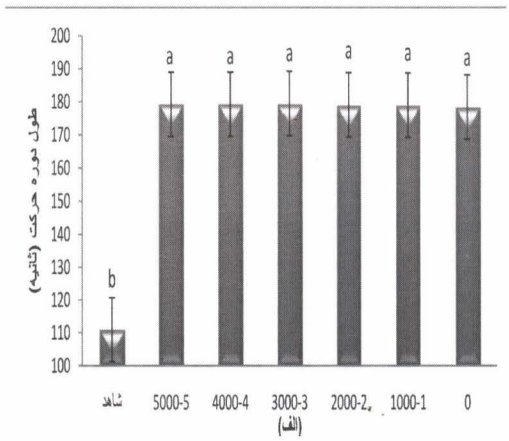
در روز نهم تاثیر سطوح مختلف آنتی بیوتیک و نسبت های مختلف رقیق سازی بر طول دوره حرکت اسپرم، تفاوت معنی داری را نشان داد ($p<0/01$). اسپرم بدون رقیق کننده و آنتی بیوتیک در دمای یخچال (تیمار شاهد) در این روز فاقد حرکت بود. در تمام تیمارهای دارای آنتی بیوتیک، طول دوره حرکت اسپرم از تیمار بدون آنتی بیوتیک بیشتر بود. تاثیر نسبت های مختلف رقیق سازی در روز نهم مثل روزهای اول و سوم بود به این صورت که نسبت ۱:۱ بیشترین تاثیر را در مقایسه با نسبت های دیگر رقیق سازی داشت (۱۵۹±۱/۴ s) و با افزایش نسبت رقیق سازی طول دوره حرکت کاهش می یافت (نمودار ۳).

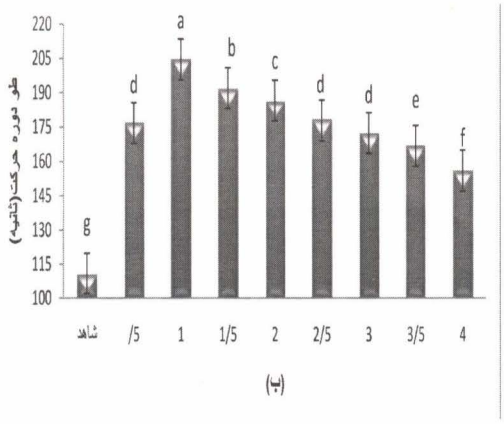




نمودار۱) تاثیر سطوح مختلف آنتی بیوتیک (الف) و نسبت های مختلف رقیق سازی (ب) روی طول دوره حرکت اسپرم روز اول

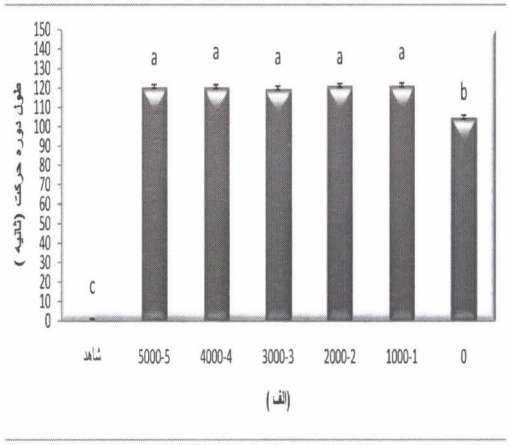
* مقادیری که با برچسب های مختلف نشان داده شده اند دارای اختلاف معنی داری می باشند (Duncan ؛ p<۰/۰۵)

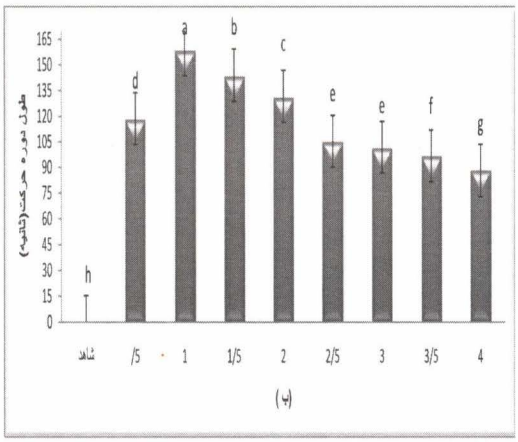




نمودار۲) تاثیر سطوح مختلف آنتی بیوتیک (الف) و نسبت های مختلف رقیق سازی (ب) روی طول دوره حرکت اسپرم روز سوم

* مقادیری که با برچسب های مختلف نشان داده شده اند دارای اختلاف معنی داری می باشند (Duncan ؛ p<۰/۰۵)





نمودار۳) تاثیر سطوح مختلف آنتی بیوتیک (الف) و نسبت های مختلف رقیق سازی (ب) روی طول دوره حرکت اسپرم روز نهم

* مقادیری که با برچسب های مختلف نشان داده شده اند دارای اختلاف معنی داری می باشند (Duncan ؛ p<۰/۰۵)

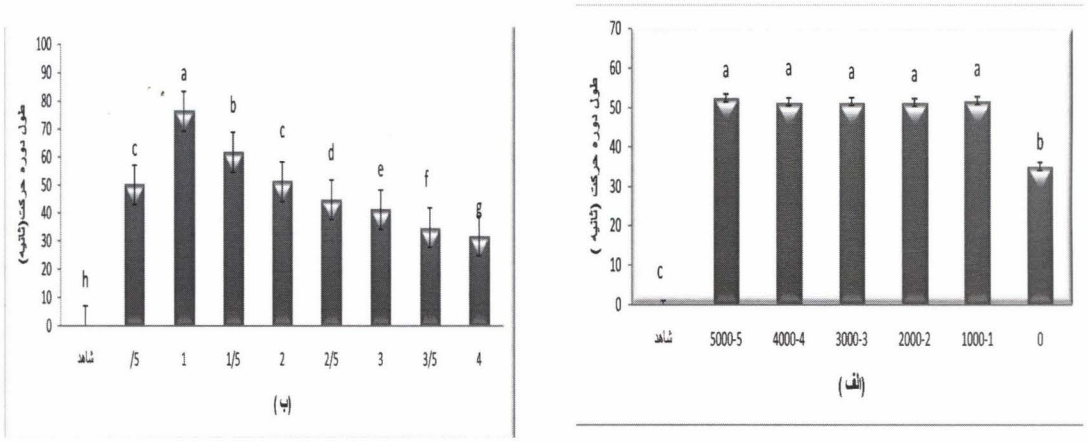
تاثیر نسبت های مختلف رقیق سازی همراه با سطوح مختلف آنتی بیوتیک روی طول دوره حرکت اسپرم، روزچهاردهم

در روز چهاردهم نگهداری اسپرم بین سطوح مختلف آنتی بیوتیک و نسبت های مختلف رقیق سازی، روی تحرک اسپرم تفاوت معنی داری مشاهده شد ($p<0/01$). در این روز تیمارهای دارای آنتی بیوتیک طول دوره حرکت اسپرم بیشتری نسبت به تیمار بدون آنتی بیوتیک داشتند و مانند دیگر روزهای بررسی شده بین تیمارهای دارای آنتی بیوتیک اختلاف معنی داری مشاهده نشد (نمودار۴). همچنین بین تیمارهای نسبت های رقیق سازی، نسبت ۱:۱ بیشترین تاثیر را روی نگهداری و طول دوره حرکت اسپرم داشت (۷۶/۲±۰/۹ s) بعد از آن نسبت رقیق سازی ۱/۱:۵ تاثیر بیشتری نسبت به دیگر تیمارهای رقیق سازی داشت اما بین تیمارهای (۰/۱:۵ و ۱:۲) اختلاف معنی داری مشاهد نشد ($p>0/05$).

تاثیر نسبت های مختلف رقیق سازی همراه با سطوح مختلف آنتی بیوتیک روی طول دوره حرکت اسپرم، روزبیست و یک

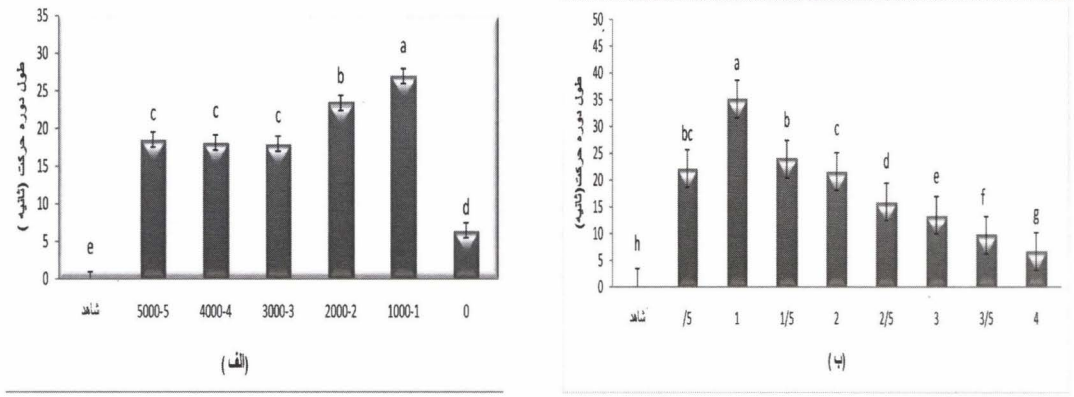
تاثیر سطوح مختلف آنتی بیوتیک و نسبت های مختلف رقیق سازی روی طول دوره حرکت اسپرم در روز بیست ویکم معنی دار بود ($p<0/01$). در این روز در بین سطوح مختلف آنتی بیوتیک تفاوت معنی داری مشاهده شد. تیمارهای ۱-۱۰۰۰ دارای بیشترین طول دوره حرکت بود (۲۶/۹±۰/۵ s) بعد از آن بیشترین طول دوره حرکت در تیمار۲-۲۰۰۰ مشاهده شد در حالی که بین تیمارهای ۳-۳۰۰۰، ۴-۴۰۰۰۰ و ۵-۵۰۰۰ تفاوت معنی داری مشاهده نشد($p>0/05$) همچنین کمترین طول دوره حرکت مربوط به تیمار بدون رقیق سازی (شاهد) بود. بین تیمارهای نسبتهای مختلف رقیق سازی، نسبت ۱:۱ بیشترین طول دوره حرکت را داشت (۳۵/۱±۰/۶ s) و کمترین طول دوره حرکت در نسبت ۴:۱ ثبت شد (نمودار ۵).

تاثیر نسبت های مختلف رقیق سازی همراه با سطوح مختلف آنتی بیوتیک روی طول دوره حرکت اسپرم، روز بیست وهشت در این روز در اکثر تیمارها، اسپرم حرکت خود را از دست داده بود. تاثیر سطوح مختلف آنتی بیوتیک و نسبت های مختلف رقیق سازی روی طول دوره حرکت اسپرم معنی دار بود ($p<0/01$). از بین سطوح مختلف آنتی بیوتیک تنها تیمارهای ۱-۱۰۰۰ و ۲-۲۰۰۰ دارای حرکت بودند ولی اختلاف معنی داری بین این دو تیمار مشاهده نشد. در بین تیمارهای مختلف رقیق سازی تنها نسبتهای ۱:۱، ۱/۵:۱ و ۲:۱ دارای حرکت بودند که بیشترین طول دوره حرکت در تیمار با نسبت رقیق سازی ۱:۱ مشاهده شد (نمودار۶).



نمودار۴) تاثیر سطوح مختلف آنتی بیوتیک (الف) و نسبت های مختلف رقیق سازی (ب) روی طول دوره حرکت اسپرم روز چهاردهم

* مقادیری که با برچسب های مختلف نشان داده شده اند دارای اختلاف معنی داری می باشند (Duncan ؛ $p<0/05$)



نمودار۵) تاثیر سطوح مختلف آنتی بیوتیک (الف) و نسبت های مختلف رقیق سازی (ب) روی طول دوره حرکت اسپرم روز بیست و یک

* مقادیری که با برچسب های مختلف نشان داده شده اند دارای اختلاف معنی داری می باشند (Duncan ؛ $p<0/05$)

بحث

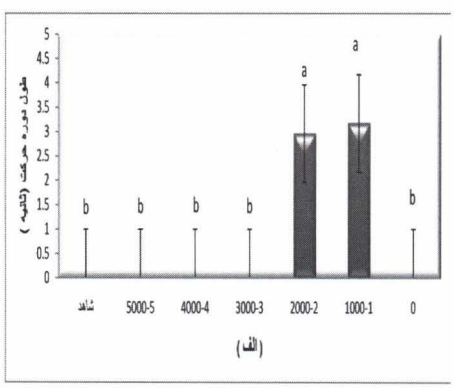
تاثیر نگهداری کوتاه مدت روی بقا و طول دوره حرکت اسپرم ماهی شیپ اسپرم ماهی شیپ)بدون رقیق سازی(در دمای آزمایشگاه (۲۳-۲۰ درجه سانتی گراد) حرکت خود را بعد از ۶ ساعت از دست داد. ولی بعد از ۵ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد دارای حرکت بود. در نتایج گزارش شده توسط Chapman و Chulhong در سال ۲۰۰۵ اسپرم *Acipenser oxyrinchus* و *Acipencer brevirostrum* در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بعد از چند ساعت حرکت خود را از دست دادند اما در دمای ۴ درجه سانتی گراد بعد از ۷-۵ روز دارای حرکت بودند(۹). اسپرم این دو گونه در دمای ۱۶-۱۴ درجه سانتی گراد بعد از ۴۸-۲۴ ساعت حرکت خود را از دست دادند (۹). طبق نتایج Mansour و همکاران در سال ۲۰۰۴ اسپرم گربه ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* فقط به مدت چند ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد دارای حرکت بود اما در دمای ۴ درجه سانتی گراد حدود دو روز قدرت حرکت خود را حفظ می کند (۱۱). Dettlaff و همکاران در سال ۱۹۹۳ بیان کردند که اسپرم ماهیان خاویاری را می توان بدون رقیق سازی به مدت ۵ تا ۶ روز با قابلیت لقاح، در دمای یخچال نگهداری کرد (۱۰). نگهداری اسپرم در دمای ۴ درجه سانتی گراد باعث کاهش نرخ متابولیسم و ثبات انرژی می شود و باعث بازمانی حرکت اسپرم می شود علاوه بر این در دمای پایین رشد باکتری کم می شود (۱۱).

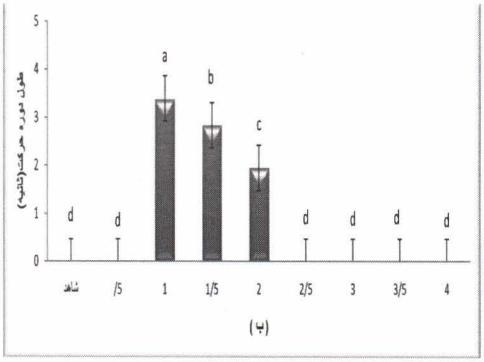
تاثیر رقیق کننده و نسبت رقیق سازی روی طول دوره حرکت اسپرم ماهی شیپ در نگهداری کوتاه مدت

محلول های رقیق کننده برای افزایش زمان نگهداری اسپرم ماهیان در نگهداری کوتاه مدت و برای بهبود تکثیر مصنوعی و همچنین برای اهداف آبزی پروری مورد استفاده قرار می گیرد (۹). رقیق کننده ها باعث افزایش حجم اسپرم شده و سلولهای اسپرماتوزوآ را از تغییرات شیمیایی و فیزیکی و یا آلودگی های موجود در محیط خودشان حفاظت می کنند (۹). در تحقیق حاضر تاثیر رقیق کننده و نسبتهای مختلف رقیق سازی روی طول دوره حرکت و زمان نگهداری اسپرم معنی دار بود بطوریکه اسپرم رقیق سازی نشده بعد از ۵ روز حرکت خود را از دست داده بود در حالی که اسپرم رقیق سازی شده در نسبت ۱:۱ تا ۲۸ روز بعد از نگهداری دارای حرکت بود (نمودار۶). با مقایسه نمودارهای ۱ تا ۶ مشخص می شود که نسبت رقیق سازی تاثیر معنی داری روی طول دوره حرکت اسپرم در نگهداری کوتاه مدت دارد ($p<0/01$). بیشترین طول دوره حرکت مربوط به تیمار رقیق سازی ۱:۱ بود و با افزایش رقیق سازی طول دوره حرکت اسپرم به صورت معنی داری کاهش می یافت. رقیق سازی اسپرم باعث کاهش تراکم اسپرم شده و اکسیژن را برای اسپرماتوزوآ فراهم می کند همچنین باعث کاهش فعالیت آنزیم[6] لیتیک موجود در سمینال پلاسمای ماهی می شود (۱۱). نسبت های زیاد رقیق سازی باعث کاهش حیات اسپرم به دلیل از دست دادن تاثیر حفاظتی ترکیبات پلاسمای سمینال می گردد (۱۳). نتایج تاثیر رقیق کننده در این تحقیق مشابه با نتایج اکبری و همکاران (۱۳۸۵) بر روی اسپرم *Huso huso* بود بطوریکه اسپرم رقیق سازی شده این گونه در محلول رقیق کننده در نسبت ۱:۱ بیش از ۳۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد دارای حرکت بود (۱). همچنین نتایج این تحقیق مشابه با نتایج Chapman و Chulhong در سال ۲۰۰۵ روی اسپرم *Acipenser oxyrinchus* و *Acipencer brevirostrum* بود بطوریکه اسپرم رقیق سازی شده این دو گونه ۲۱ تا ۲۸ روز بعد از رقیق سازی دارای حرکت بودند در حالی که اسپرم رقیق سازی نشده تنها ۷ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد دارای حرکت بود (۹).

تاثیر سطوح مختلف آنتی بیوتیک روی طول دوره حرکت اسپرم ماهی شیپ در نگهداری کوتاه مدت

در ماهیانی که برای به دست آوردن اسپرم ناچاراً باید ماهی کشته شود[7] مانند *Clarias gariepinus،C.gariepinus، C.macrocephalus، C.batrachus، Esox lucius* و *Heteropneustes fossilis* علاوه بر اسپرماتوزآ سلولهای دیگری مثل فیبروبلاست ها، سلولهای خونی و.. وجود دارد که این سلولهای مرده منبعی برای رشد باکتری می باشند در ماهیانی که اسپرم از طریق فشار ناحیه[8] شکمی به دست می آید آلودگی ادراری و مدفوع وجود دارد که اینها نیز منبعی برای آلودگی و رشد باکتری می باشند (۱۱).آلودگی باکتریایی به علت تولید آنزیم خارج سلولی و مصرف اکسیژن باعث کاهش کیفیت اسپرم در طول دوره نگهداری می شود (۱۲). با توجه به نمودارهای ۳ و۴ در روزهای نهم و چهاردهم بین تیمارهای دارای آنتی بیوتیک و تیمار بدون آنتی بیوتیک اختلاف معنی داری مشاهده شد اما بین سطوح مختلف آنتی بیوتیک اختلاف معنی داری





نمودار۴-۶) تاثیر سطوح مختلف آنتی بیوتیک (الف) و نسبت های مختلف رقیق سازی (ب) روی طول دوره حرکت اسپرم روز بیست و هشت

* مقادیری که با برچسب های مختلف نشان داده شده اند دارای اختلاف معنی داری می باشند (Duncan ؛ $p<0/05$)

مشاهده نشد با توجه به نمودار ۵ در بیست یک روز بعد از نگهداری اسپرم در دمای ۴ درجه سانتی گراد بین سطوح مختلف آنتی بیوتیک تفاوت معنی داری وجود داشت به این صورت که تیمار های ۱- ۱۰۰۰ و ۲-۲۰۰۰ بیشترین طول دوره حرکت را داشتند و بین بقیه تیمارهای دارای آنتی بیوتیک تفاوت معنی داری مشاهده نشد اما همه تیمارهای دارای آنتی بیوتیک دارای طول دوره حرکت بیشتری نسبت به تیمار بدون آنتی بیوتیک بودند. همچنین در روز بیست و هشتم (نمودار ۶) تنها تیمارهای ۱-۱۰۰۰ و ۲-۲۰۰۰ دارای حرکت ناچیزی بودند. در روزهای بیست و یک و بیست هشت سطوح بالای آنتی بیوتیک تاثیر کمتری نسبت به سطوح پایین آنتی بیوتیک داشتند. غلظت های بالای آنتی بیوتیک باعث کاهش ماندگاری اسپرم و فعالیت میتوکندری اسپرم می شود (۱۴). اسپرم پاروپوزه[9] نگهداری شده در محلول رقیق کننده ۱۵۰Mm NaCl به نسبت ۱:۱ همراه با ۵۰۰۰ واحد پنی سیلین همراه با ۵ میلی گرم استروپتومایسین نگهداری شده در دمای ۱ درجه سانتی گراد قابلیت لقاح خود را تا ۲۵ روز بعد از رقیق سازی حفظ کرده، و بعد از ۲۶ روز از نگهداری اسپرم ها توانایی حرکت را داشتند (۷). اضافه کردن آنتی بیوتیک به محلول رقیق کننده اسپرم ماهی شیپ باعث افزایش زمان ماندگاری اسپرم در نگهداری کوتاه مدت می شود. طبق نتایج این تحقیق اضافه کردن دوزهای ۱۰۰۰ واحد پنی سیلین، ۱ میلی گرم استروپتومایسین یا ۲-۲۰۰۰ به رقیق کننده برای کنترل رشد باکتری در نگهداری کوتاه مدت توصیه می شود. در کل رقیق کننده (مورد استفاده در این تحقیق) در نسبت رقیق سازی ۱:۱ و آنتی بیوتیک تاثیر معنی داری روی حرکت اسپرم ماهی شیپ در نگهداری کوتاه مدت دارد اسپرم نگهداری شده در رقیق کننده را می توان تا ۲۱ روز بعد از نگهداری در یخچال برای عملیات تکثیر استفاده کرد و استفاده از این رقیق کننده برای نگهداری اسپرم این گونه در معرض انقراض در مراکز تکثیر ماهیان خاویاری توصیه می شود. همچنین پیشنهاد می شود تاثیر آنتی اکسیدان ها، آلبومین سرم گاوی و زرده تخم مرغ به عنوان نگهدارنده غشای اسپرم در نگهداری کوتاه مدت این گونه بررسی شود.

تشکر و قدردانی

از مسئولین آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به دلیل در اختیار قرار دادن امکانات و راهنماییهای لازم در این تحقیق تشکر و قدر دانی می گردد. همچنین از مسئولین وکارشناسان مرکز تکثیر ماهیان خاویاری شهید مرجانی به دلیل هماهنگی های لازم و راهنماهی هایشان کمال تشکر را دارم.

پاورقی ها

1-Internutional Union for Conservation of natural and natural vesources.

2- Short-Term Storage
3- Cryopreservction
4- Extender
5- Pooled
6- Lytic
7- Testicular Semen
8- Spermatic cluct Semen

منابع مورد استفاده

۱- اکبری، پ. باغفلکی، م. شالویی، ف. ایمانپور،م. ۱۳۸۵. بررسی اثر برخی مواد رقیق کننده بر افزایش طول دوره حرکت اسپرم در فیل ماهی. خلاصه مقالات پنجمین همایش سراسری علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی (واحد قائم شهر). ۲۳۳ صفحه

۲- ایزدی،ع.۱۳۷۱. بررسی اسپرم تاس ماهیان و طرز نگهداری اسپرم در ماهیان مختلف.پایان نامه کارشناسی دانشگاه تهران.دانشکده منابع طبیعی کرج،۹۴ صفحه.

۳- حفظ الصحه ،ف.۱۳۸۵. اثر رقیق کننده ها روی برخی از پارامترهای اسپرم شناختی، موفقیت لقاح و کیفیت لاروی ماهی سفید *Rutilus frisii*. پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات.دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.دانشکده شیلات، ۹۱ صفحه.

۴- شالویی،ف.۱۳۸۶. بررسی تاثیر برخی از رقیق کننده ها و آنتی بیوتیک روی نگهداری کوتاه مدت و حرکت اسپرم در ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*).پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.دانشکده شیلات،۸۸ صفحه.

5-Alavi, S.M.H. Amirei, B. Cooson, J.Karamei, M.Abdollahei, H.Pourkazemi, M..2006. Determination of some seminal plasms indices,sperm density and motility in the Persian sturgeon Acipenser persicus.IJFS 5(2) 19-40

6-Billard, R.,Lecointre, G. 2001.Biology and conservation of sturgeon and paddle fish.Cons.Biol.7: 773-787.

7-Brown, G.G., Mims, S.D., 1995. Storage, transportation, and fertility of undiluted and diluted paddlefish milt. Prog. Fish-Cult. 57, 64– 69.

8-Chao, N.H., Liao, I.C., 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. Aquaculture 197, 161–189.

9-Chulhong park Frank ,A.Chapman,.2005. An Extender solution for the short-term storage of Sturgeon semen.North American Jornal of Aquaculture 67:52.57

10-Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S., Schmalhausen, O.I., 1993. Sturgeon Fishes Developmental Biology and Aquaculture. Springer, Berlin. 300 pp.

11-Mansour, N ;Lahnsteiner, F.Berger, B.,2004. Characterization of the testicular semen of the African catfish, Clarias gariepinus, and its short-term storage.Aquaculture Research, 35, 232-244

12-Maria, A.N ; Viveiros, A.T.M., Freitas, R.T.F.,Oliveira, A.V.,2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracajuba (*Brycon orbignyanus*) semen,an endangered brazilian teleost fish. Aquaculture260,298-306

13-Rurangwa, E. ; Kime, DE. ; Ollevier, F. ; and Nash, JP.2004. Measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture;234:1-28.

14-Segovia, M., Jenkins, J.A., Paniagua-Chavez, C., Tiersch, T.R., 2000. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia Theriogenology 53, 1489–1499.

15-Vecsei, P; Artykhin, A. and Peterson, D.,2002.Thereated fishes of the world. Environmental Biology of Fishes 65: 455–456.

16-Toth, G.P. Ciereszko,A. Christ, S.A. and Dabrowski, k. 1997. Objective analysis of sperm motility in the Lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: Activation and inhibition conditions. Aquaculture.154:337-348