تعیین شرایط بهینه یونی و اسمزی جهت فعالیت اسپرماتوزوآی ماهی بنی *Barbus sharpeyi*

رضا لرستانی[۱]، محمدرضا کلباسی[۲*]، جاسم غفله مرمضی[۳]

۱ـ دانشجوی دکتری شیلات، گروه آبزی پروری، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، استان مازندران، نور، پست الکترونیکی: reza_lorestany@yahoo.com

۲ـ دانشیار گروه آبزی پروری دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، استان مازندران، نور، پست الکترونیکی: kalbassi_m@modares.ac.ir

۳ـ دانشیار پژوهشکده آبزی پروری جنوب، مرکز تحقیقات شیلات ایران، استان خوزستان، اهواز، پست الکترونیکی: jmarammazi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۲۹ ** نویسنده مسوول* *تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۹*

© نشریه علمی ـ پژوهشی اقیانوس‌شناسی ۱۳۹۱، تمامی حقوق این اثر متعلق به نشریه اقیانوس‌شناسی است.

چکیده

هدف از مطالعه حاضر، تعیین سطوح بهینه یون‌های سدیم، کلسیم، پتاسیم، ساکاروز و فشار اسمزی در محلول‌های فعال کننده برای افزایش دوره تحرک اسپرماتوزوآی ماهی بنی *Barbus sharpeyi* بوده است. همچنین اثر محلول‌های متفاوت فعال کننده بر سرعت قوس‌دار، خطی و درصد حرکت خطی سلول‌های اسپرماتوزوآی ماهی‌بنی مورد ارزیابی قرار گرفته است. نتایج نشان داد که غلظت‌های ۱۰۰ میلی مول در لیتر یون سدیم، ۵۰ میلی مول در لیتر یون پتاسیم و ۲/۵ میلی مول در لیتر یون کلسیم، شرایط بهینه را جهت تداوم دوره حرکتی اسپرماتوزوآ ایجاد نموده است. همچنین مناسب‌ترین سطح فشار اسمزی محلول‌های فعال کننده اسپرم ماهی بنی، میزان ۳/۴±۱۷۹ میلی اسمول بر کیلوگرم بود. نتایج نشان داد که بالاترین سرعت قوس‌دار و خطی اسپرماتوزوئیدها، در تیمار ۵۰ میلی مول در لیتر NaCl ارزیابی شده است. همچنین بالاترین درصد حرکت خطی اسپرماتوزوئیدهای ماهی بنی، در تیمارهای ۱۰۰ میلی مول در لیتر NaCl و ۲۰ میلی مول در لیتر Tris مشاهده شده است ($P\leq 0/05$). به‌عنوان جمع‌بندی نهایی پیشنهاد می‌گردد که جهت کسب تحرک بهینه اسپرماتوزوئیدهای ماهی بنی، به‌طور جداگانه از غلظت‌های ۱۰۰ میلی مول در لیتر یون سدیم، ۵۰ میلی مول در لیتر یون پتاسیم، ۲/۵ میلی مول در لیتر یون کلسیم و ۱۵۰ میلی مول بر لیتر ساکاروز در محلول‌های فعال‌کننده استفاده گردد. همچنین پیشنهاد می‌شود که جهت فعال سازی اسپرماتوزوئیدهای ماهی بنی از محلول فعال‌کننده با ترکیب ۵۰ میلی مول در لیتر NaCl، ۳۰ میلی مول کلرید پتاسیم و ۳۰ میلی مول تریس در لیتر و با فشار اسمزی ۱۸۹ میلی اسمول بر کیلوگرم، استفاده شود.

کلمات کلیدی: *اسپرم، تحرک، یون، فشار اسمزی، ماهی بنی.*

۱. مقدمه

ماهی بنی *Barbus sharpeyi* از راسته Cypriniformes، از خانواده Cyprinidae و از جنس باربوس است (Pyka et al., 2001). *B. sharpeyi* که با نام محلی بنی شناخته شده، از مهمترین ماهیان حوضه دجله و فرات و یکی از ۳۰۰ گونه باربوس ماهیان جهان است که به‌عنوان یک گونه در معرض خطر انقراض گزارش شده است (Al Mukhtar et al., 2009; Al Mukhtar et al., 2006). پراکندگی جغرافیایی ماهی بنی، محدود به کشور ایران و برخی کشورهای همسایه از قبیل عراق، سوریه و ترکیه است که خود یکی از دلایلی است که تاکنون مطالعات زیادی بر روی تکثیر آن صورت نگرفته است (Coad, 1995; Eschmeyer, 1999; Kahkesh et al., 2010). زیستگاه طبیعی و اصلی این ماهی در ایران، تالاب‌های شادگان و هورالعظیم هستند که بالاترین درصد کپور ماهیان این تالاب ها را به‌خود اختصاص داده است (AL Mukhtar et al., 2006). ماهی بنی به‌عنوان یک گونه‌ی بومی و حائز اهمیت از نظر اقتصادی است و تکثیر و پرورش آن مورد توجه دست‌اندرکاران صنعت تکثیر و پرورش آبزیان استان خوزستان است (محمدیان و همکارن، ۱۳۸۸). بر اساس اطلاعات موجود، اگرچه تکثیر این ماهی در ایران انجام شده است، ولی به علل ناشناخته، درصد لقاح و بازده تکثیر گونه مذکور رضایت بخش نبوده است (Pyka et al., 2001). با این دیدگاه، لزوم اصلاح شرایط تکثیر ماهی بنی جهت افزایش کارایی تکثیر آن، از طریق مطالعه گامت های جنسی و عوامل متفاوت تاثیر گذار بر کیفیت آنها ضروری بنظر می‌رسد.

در مراکز تکثیر و پرورش ماهی، بیشتر به کیفیت تخمک‌ها و لاروها توجه می‌شود، در حالی که کیفیت اسپرم و تخمک، به‌طور مشترک، می‌توانند بر موفقیت لقاح و بازماندگی لاروها تاثیر گذار باشند و در تعدادی از گونه‌ها، کیفیت پایین اسپرم می تواند عامل محدود کننده‌ی تکثیر آنها تلقی گردد. بنابراین مطالعه در خصوص اسپرم و شناخت وقایعی که منجر به تولید گامت با کیفیت می‌شود و همچنین عواملی که کیفیت اسپرم را کاهش می‌دهند، الزامی است (Bozkurt, 2006). مهمترین مشخصه کیفی اسپرم، تحرک سلول های اسپرماتوزوئید است (Kalbassi and Lorestani, 2007) و مطالعه در خصوص تحرک اسپرم، محدود به گونه‌های اندکی از ماهیان شده است، در حالی که گونه های زیادی تا به حال شناخته شده‌اند و مطالعه‌ی جامعی بر روی اسپرم آنها صورت نگرفته است (Billard and Cosson, 1992; Utarabhand and Watankul, 1998; Alavi and Cosson, 2005; Pavlov and Emelyanova, 2006). طول دوره‌ی تحرک، سرعت و طول دوره‌ی حرکت رو به جلوی سلول‌های اسپرماتوزوئید، به‌وسیله‌ی پارامترهای متعددی از قبیل دما، pH، یون‌ها (شامل سدیم، پتاسیم، کلسیم و ...)، فشار اسمزی، میزان رقیق سازی اسپرم به‌وسیله‌ی محلول‌های فعال‌کننده و غیر فعال‌کننده، فصل اسپرم گیری (Bobe and Labbé, 2010 ; Mylonas et al., 2010) و همچنین ریخت‌شناسی (مرفولوژی) و ساختار اسپرماتوزوئیدها (Psenicka et al., 2009)، تحت تاثیر قرار می‌گیرد و درک تاثیر پارامترهای یاد شده در کسب بهترین روش جهت تلقیح مصنوعی و همچنین کسب اطلاعات در خصوص روش‌ها و شرایط مناسب نگهداری کوتاه‌مدت و طولانی مدت اسپرم، مفید است (Alavi et al., 2007; Rosengrave et al., 2008).

با توجه به موارد فوق، انجام تحقیق حاضر، از طریق مطالعه کیفیت اسپرم و نقش آن در خصوص دست‌یابی به بیوتکنیک مناسب تکثیر ماهی بنی و همچنین بررسی پارامترهای متفاوت یونی و اسمزی تاثیر گذار بر کیفیت اسپرم این ماهی در جهت افزایش کارایی تکثیر آن، می‌تواند سبب افزایش کارایی لقاح در ماهی بنی (که در میان گونه‌های متفاوت باربوس ماهیان جنوب، حائز کمترین میزان لقاح است) گردد. همچنین در این تحقیق نقش محلول‌های متفاوت فعال‌کننده نمکی بر روی کیفیت اسپرم و قابلیت لقاحی آن مورد مطالعه و ارزیابی قرار می‌گیرد.

۲. مواد و روش‌ها

محل انجام تحقیق حاضر در مرکز تکثیر باربوس ماهیان جنوب کشور واقع در دشت آزادگان استان خوزستان بود. کل مدت تحقیق ۱۲ ماه به‌طول انجامید که عملیات میدانی آن از ابتدای اسفند ماه سال ۱۳۸۹ آغاز شد و تا اردیبهشت ماه ۱۳۹۰ ادامه داشت. جهت اجرای تحقیق حاضر تعداد ۶ مولد نر مورد تزریق داخل صفاقی ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم هورمون LHRHA2 (Park et al., 2002, Zohar and Mylonas, 2001; Caille et al., 2006; Podhorec and Kouril, 2009) در ترکیب با ۲/۵ میلی گرم متوکلروپرامید (بعنوان آنتی دوپامین) با حجم ۱ سی سی (Horvath et al., 2007; Yosefian et al., 2008) قرار گرفتند. پس از گذشت ۸ ساعت، از مولدین نر تزریق شده،

اسپرم‌گیری صورت گرفت (Silla, 2011; Cejko et al., 2011). میانگین طول کل نرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر ۴/۳۳±۴۳/۴۰ سانتی متر و میانگین وزن آنها معادل ۲۳۴/۱۵±۹۱۶ گرم بود.

۲ـ۱. فعال‌سازی تحرک اسپرماتوزوئیدها

جهت سنجش اثر عوامل متفاوت یونی، اسمزی و فعال‌کننده‌های متفاوت اسپرم، بر کارایی تحرک اسپرماتوزوئیدهای ماهی بنی، ۲۷ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار در نظر گرفته شد و اثر آنها بر پارامترهای حرکتی مخلوط اسپرم ۶ مولد نر ماهی بنی مورد مطالعه قرار گرفت. به‌منظورآماده‌سازی محلول‌های فعال‌کننده مختلف (نمک کلرید سدیم، کلرید پتاسیم، دی کلرید کلسیم، تریس HCl، سولفات منیزیم، HEPES و ساکاروز از شرکت مرک آلمان)، ترکیبات مواد آزمایشگاهی مربوط به هر یک توزین شده و سپس در یک لیتر آب مقطر کاملا حل شد (جدول ۱). سنجش اثر ترکیبی یون‌های متفاوت بر پارامترهای حرکتی اسپرماتوزوآی ماهی بنی با استفاده از محلول‌های ۱ تا ۸ (جدول ۱) صورت گرفت.

برای ارزیابی اثر سطوح متفاوت یون سدیم بر تحرک اسپرم ماهی بنی، از سطوح ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مول در لیتر سدیم استفاده شد (جدول ۱، فعال کننده ۱۰ تا ۱۲). همچنین سنجش اثر یون پتاسیم بر تحرک اسپرماتوزوآی ماهی بنی، در سطوح ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مول یون پتاسیم در لیتر انجام شد (جدول ۱، فعال کننده ۱۳ تا ۱۵). در خصوص ارزیابی اثر سطوح یون کلسیم بر فاکتورهای تحرک اسپرماتوزوآی ماهی بنی، سطوح ۰، ۰/۵، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی مول بر لیتر از یون کلسیم بررسی شد (جدول۱، فعال کننده ۲۲ تا ۲۶). همچنین جهت ایجاد فشار اسمزی های متفاوت در محلول‌های فعال سازی اسپرم، از ساکاروز با سطوح ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی مول در لیتر (جدول ۱، فعال کننده ۱۶ تا ۲۱) استفاده شد (Wilson-Leedy et al., 2009; Alavi et al., 2009). در تمامی سطوح یونی و اسمزی فوق از ۲۰ میلی مول در لیتر تریس بعنوان بافر استفاده شد (فعال کننده ۹). در همه تیمارها از محلول ۲۰ میلی مول تریس در لیتر به‌عنوان گروه شاهد استفاده شد.

۲ـ۲. سنجش تحرک اسپرماتوزوئیدها

سنجش شاخص‌های تحرک اسپرم در نمونه‌های مورد بررسی از روش Bozkurt در سال (۲۰۰۶) و Alavi و همکاران، (۲۰۰۹) صورت گرفت و در این خصوص مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآها با استفاده از میکروسکوپ نوری (میکروسکوپ بیولوژی مدل BM-180NP ساخت شرکت صنایع اپتیک اصفهان) و با بزرگ‌نمایی ۱۰x، تا متوقف شدن حرکت موجی، ۹۵ و ۹۹ درصد سلول های اسپرماتوزوآ ارزیابی شد.

۲ـ۳. سنجش سرعت قوس‌دار، خطی و درصد حرکت خطی اسپرماتوزوئیدها

سنجش سرعت قوس دار، خطی و درصد حرکت خطی سلول‌های اسپرماتوزوئید در ماهی بنی با استفاده از روش Pavlov و همکاران در سال (۲۰۰۶)، Wilson Leedy and Ingermann در سال (۲۰۰۷) و Fauvel و همکاران در سال (۲۰۱۰) انجام شد. به‌طور خلاصه، در هر تکرار ۱۰۰ میکرولیتر اسپرم رقیق شده با محلول رقیق کننده (۱۵۰ میلی مول بر لیتر نمک، ۲۰ میلی مول بر لیتر تریس، pH معادل با ۸/۵ و فشار اسمزی ۳۶۶ میلی اسمول بر کیلوگرم) با ۱۰۰ میکرولیتر از هر محلول فعال‌کننده‌ی یونی (۲۰ میلی مول بر لیتر تریس، ۵۰ میلی مول بر لیتر یون سدیم،۱۰۰ میلی مول بر لیتر یون سدیم،۵۰ میلی مول بر لیتر کلرید پتاسیم، ۱۰۰ میلی مول بر لیتر کلرید پتاسیم، ۲/۵ میلی مول بر لیتر کلرید کلسیم، ۲۵ میلی مول بر لیتر ساکاروز و ۱۰۰ میلی مول بر لیتر ساکاروز)، در لام اسپرم متر (ساخت کشور هندوستان) قرار داده شده و به‌وسیله‌ی میکروسکوپ نوری (مدل BM-180NP ساخت شرکت صنایع اپتیک اصفهان) با لنز شی ۱۰ توسط دوربین فیلمبرداری (سامسونگ مدل SCC-B2007P ساخت چین) از تحرک اسپرم، قطعات ویدئویی تهیه شد. سپس فیلم‌های تهیه شده به‌وسیله‌ی نرم افزار Image J (نسخه ۱/۴۲q تحت سیستم عامل ویندوز ایکس پی) آنالیز شد و مقادیر سرعت قوس‌دار، خطی و درصد حرکت خطی سلول‌های اسپرماتوزوئید ارزیابی شد. در هر فعال کننده ۳ قطعه ویدئویی بعنوان ۳ تکرار تهیه و سپس شاخص‌های متفاوت تحرک اسپرماتوزوئید در آنها بررسی شد.

جدول ۱ـ ترکیبات فعال‌کننده‌های نمکی مورد استفاده در تحقیق حاضر جهت فعال‌سازی اسپرماتوزوآی ماهی بنی

ترکیبات محلول‌ها	NaCl	KCl	Tris-Hcl	CaCl2	MgSO4	HEPES	Sucrose	pH	رفرنس
فعال کننده ۱	۴۵ mM	۵ mM	۲۰ mM	*	*	*	*	۹	Linhart et al., 2000
فعال کننده ۲	*	*	۳۰ mM	۱۰ mM	*	*	*	۸	Warnecke and Pluta, 2003
فعال کننده ۳	۵۵ mM	۱۰ mM	۱۰ mM	۱ mM	*	*	*	۷/۵	Hu et al., 2009
فعال کننده ۴	۴۵ mM	۵ mM	۳۰ mM	*	*	*	*	۸/۲	Boryshpolets et al., 2009
فعال کننده ۵	۵۰ mM	*	۲۰ mM	*	*	*	*	۹	Lahnsteiner et al., 2003
فعال کننده ۶	۵۰ mM	*	۲۰ mM	*	۱ mM	*	*	۸/۵	Lahnsteiner et al., 2003
فعال کننده ۷	۲۵ mM	۲۵ mM	*	*	*	۵ mM	*	۷/۲	Emri et al., 1998
فعال کننده ۸	۵۰ mM	۳۰ mM	۳۰ mM	*	*	*	*	۸/۵	Bastami et al., 2009
فعال کننده ۹	*	*	۲۰ mM	*	*	*	*	۸	Alavi et al., 2009
فعال کننده ۱۰	۵۰ mM	*	۲۰ mM	*	*	*	*	۸	Alavi et al., 2009
فعال کننده ۱۱	۱۰۰ mM	*	۲۰ mM	*	*	*	*	۸	Alavi et al., 2009
فعال کننده ۱۲	۱۵۰ mM	*	۲۰ mM	*	*	*	*	۸	Alavi et al., 2009
فعال کننده ۱۳	*	۵۰ mM	۲۰ mM	*	*	*	*	۸	Alavi et al., 2009
فعال کننده ۱۴	*	۱۰۰ mM	۲۰ mM	*	*	*	*	۸	Alavi et al., 2009
فعال کننده ۱۵	*	۱۵۰ mM	۲۰ mM	*	*	*	*	۸	Alavi et al., 2009
فعال کننده ۱۶	*	*	۲۰ mM	*	*	*	۲۵ mM	۸	Wilson-Leedy et al., 2009
فعال کننده ۱۷	*	*	۲۰ mM	*	*	*	۵۰ mM	۸	Wilson-Leedy et al., 2009
فعال کننده ۱۸	*	*	۲۰ mM	*	*	*	۱۰۰ mM	۸	Wilson-Leedy et al., 2009
فعال کننده ۱۹		*	۲۰ mM	*	*	*	۱۵۰ mM	۸	Wilson-Leedy et al., 2009
فعال کننده ۲۰	*	*	۲۰ mM	*	*	*	۲۰۰ mM	۸	Wilson-Leedy et al., 2009
فعال کننده ۲۱	*	*	۲۰ mM	*	*	*	۳۰۰ mM	۸	Wilson-Leedy et al., 2009
فعال کننده ۲۲		*	۲۰ mM	۰/۵ mM	*	*	*	۸	Alavi et al., 2009
فعال کننده ۲۳	*	*	۲۰ mM	۲/۵ mM	*	*	*	۸	Alavi et al., 2009
فعال کننده ۲۴	*	*	۲۰ mM	۵ mM	*	*	*	۸	Alavi et al., 2009
فعال کننده ۲۵	*	*	۲۰ mM	۷/۵ mM	*	*	*	۸	Alavi et al., 2009
فعال کننده ۲۶	*	*	۲۰ mM	۱۰ mM	*	*	*	۸	Alavi et al., 2009
آب مقطر	*	*	*	*	*	*	*	*	
آب کارگاه تکثیر	*	*	*	*	*	*	*	*	

۲ـ۴. سنجش فشار اسمزی و *pH* محلول‌های متفاوت فعال‌سازی

سنجش فشار اسمزی محلول‌های مورد بررسی با استفاده از دستگاه اسمومتر OSMOMAT 030 مدل MOMATOS 030 ساخت کشور ژاپن محاسبه شد (Wilson-Leedy et al., 2009; Alavi et al., 2009). بدین منظور پس از تنظیم دستگاه اسمومتر در فشار اسمزی صفر با استفاده از آب مقطر و فشار اسمزی ۳۰۰ میلی اسمول بر کیلوگرم با استفاده از محلول استاندارد، مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه در ۳ تکرار در اپندروف ۰/۵ میلی لیتری قرار داده شده و پس از قرار دادن آن بر روی سنسور دستگاه اسمومتر، فشار اسمزی محلول‌ها ارزیابی شد. برای سنجش pH محلول‌های مورد مطالعه از دستگاه pH متر مدل HANNA ۲۱۱ استفاده شد.

۲ـ۵. پردازش آماری داده‌ها

اطلاعات جمع آوری شده از مطالعات میدانی و آزمایشگاهی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پس از تائید نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگراف اسمیرنف، برای سنجش اثر سطوح متفاوت یونی و فشار اسمزی در فعال‌کننده‌های نمکی متفاوت و اثر آنها بر پارامترهای حرکتی اسپرماتوزوئید، از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد. همچنین جهت سنجش مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۹۵٪ استفاده شد.

۳. نتایج

۳ـ۱. اثر فعال‌کننده‌های ترکیبی متفاوت بر پارامترهای حرکتی اسپرماتوزوآی ماهی بنی

بالاترین میزان تحرک موجی شکل اسپرماتوزوآی ماهی بنی به‌وسیله‌ی محلول‌های ۴، ۷ و ۸ ایجاد شد که اگرچه اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۹۵ درصد با هم نداشتند ($P\geq ۰/۰۵$)، ولی با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را از لحاظ آماری نشان دادند ($P\leq ۰/۰۵$). نتایج نشان داد که بالاترین طول دوره‌ی تحرک تا زمان توقف ۹۵ درصد از سلول‌های اسپرماتوزوئید و همچنین

توقف کامل سلول‌های اسپرماتوزوئید بوسیله محلول‌های ۴ و ۸ ایجاد شد (جدول ۲).

جدول ۲ـ مطالعه مقایسه‌ای اثر محلول‌های متفاوت بر تحرک سلول‌های اسپرماتوزوئیدهای بنی (ثانیه)

شماره محلول	تحرک موجی شکل (ثانیه)	توقف ۹۵ درصد سلول‌ها (ثانیه)	توقف کامل سلول‌ها (ثانیه)	فشار اسمزی (میلی اسمول بر کیلوگرم)
۱	۱۱/۳۳±۱/۷۶^{e}	۷۸±۴/۳۵^{c,d}	۱۰۳±۱/۷۳^{c,d}	۲۱۸±۰/۳a
۲	۱۵/۳۳±۲/۹۰^{d,e}	۳۹/۳۳±۳/۸۴^{f}	۴۹/۳۳±۳/۶۶^{f}	۵۲±۱/۸e
۳	۲۲/۶۶±۳/۷۱^{b,c}	۱۰۰/۶۷±۲/۱۸^{b}	۱۲۲±۴/۱۶^{b}	۲۲۰±۷/۸a
۴	۳۴±۱^{a}	۱۱۹/۶۷±۷/۸۵^{a}	۱۴۴/۶۶±۳/۱۷^{a}	۱۸۸±۲/۲b
۵	۲۸/۳۳±۲/۳۳^{a,b}	۹۰/۶۶±۵/۵۴^{b,c}	۱۱۴/۳۳±۹/۹۳^{b,c}	۱۷۳±۴/۷c
۶	۲۸±۱/۵۲^{a,b}	۹۱±۸/۷۱^{b,c}	۱۰۹±۷/۳۷^{b,c,d}	۱۷۷±۱/۷c
۷	۳۲±۲/۰۸^{a}	۸۲±۴/۳۵^{b,c}	۹۷±۳/۶^{d}	۱۳۵±۰/۶d
۸	۳۴±۱/۵۲^{a}	۱۲۳/۶۶±۱۲/۴۲^{a}	۱۴۴/۳۳±۱۰/۲۶^{a}	۱۸۹±۱/۷b
آب کارگاه	۲۵±۲/۶۴^{b,c}	۶۱±۱/۵۲^{d,e}	۶۸/۶۶±۰/۸۸^{e}	۳۶±۰/۶f
آب مقطر	۲۰±۱/۵۲^{c,d}	۴۹±۱/۵۲^{e,f}	۶۲±۲/۳۰^{e,f}	۰g

۳ـ۲. اثر یون سدیم بر پارامترهای حرکتی اسپرماتوزوآی ماهی بنی

نتایج نشان داد که بین سطوح ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مول بر لیتر یون سدیم، اختلاف معنی داری آماری از لحاظ تحرک موجی شکل اسپرماتوزوئیدها وجود ندارد (P≥۰/۰۵) و در این سطوح تحرک موجی شکل در بالاترین سطح خود قرار دارد. همچنین نتایج مشخص کرد که در سطح ۱۵۰ میلی مول بر لیتر از یون سدیم، پارامترهای حرکتی اسپرماتوزوآ به صفر رسیده است و در مقایسه با سایر تیمارهای مورد بررسی، بالاترین سطح فشار اسمزی ثبت شد (جدول ۳). به‌علاوه، غلظت ۱۰۰ میلی مول یون سدیم، بالاترین دوره پارامترهای حرکتی اسپرماتوزوئید را در مقایسه با سایر تیمار ها نشان داد که لحاظ آماری نیز واجد اختلاف معنی داری بود (P≤۰/۰۵). همچنین نتایج حاصل از اثر غلظت‌های متفاوت یون سدیم بر سطح فشار اسمزی محلول های فعال کننده اسپرم نشان داد که بالاترین سطح فشار اسمزی مربوط به تیمار ۱۵۰ میلی مول بر لیتر یون سدیم و کمترین آن مربوط به گروه شاهد (۲۰ میلی مول بر لیتر تریس) بوده است (جدول ۳).

جدول ۳ـ اثر سطوح یون سدیم بر فشار اسمزی محلول های فعال کننده و دوره تحرک اسپرماتوزوآی ماهی بنی

سطوح متفاوت سدیم (میلی مول)	تحرک موجی شکل (ثانیه)	توقف ۹۵ درصد از سلول‌های اسپرماتوزوئید (ثانیه)	توقف کامل (ثانیه)	فشار اسمزی (میلی اسمول به کیلوگرم)
۰	۲۳±۱/۱۵^{a}	۴۸/۶۶±۲/۹۰^{c}	۵۸/۳۳±۴/۰۵^{b}	۳/۹±۰^{d}
۵۰	۲۳±۳^{a}	۷۷/۳۳±۸/۹۶^{b}	۱۰۲/۳۳±۵/۰۴^{a}	۱۹۳±۰^{c}
۱۰۰	۲۹/۳۳±۲/۶۰^{a}	۹۵±۲/۸۸^{a}	۱۰۶/۶۷±۵/۶۹^{a}	۲۳۰±۲/۹^{b}
۱۵۰	۰^{b}	۰^{d}	۰^{c}	۳۳۶±۷/۲^{a}

۳ـ۳. اثر یون پتاسیم بر پارامترهای حرکتی اسپرماتوزوآی ماهی بنی

بالاترین دوره تحرک موجی شکل در سطوح ۰ و ۵۰ میلی مول پتاسیم ارزیابی شد. همچنین نتایج نشان داد که بالاترین دوره‌ی حرکتی اسپرماتوزوئید در سطح ۵۰ میلی مول بر لیتر از یون پتاسیم مشاهده شده است و این تیمار دارای اختلاف معنی دار آماری با سایر گروه‌های مورد بررسی در جدول ۴ بوده است (P≤۰/۰۵). همچنین نتایج مشخص نمود که حرکت اسپرماتوزوآی ماهی بنی در سطح فشار اسمزی ۱۵۰ میلی مول بر لیتر از یون پتاسیم کاملا متوقف می‌شود. به‌علاوه، بالاترین سطح فشار اسمزی در تیمارهای مورد بررسی در جدول ۴، مربوط به سطح ۱۵۰ میلی مول بر لیتر یون پتاسیم بود که با سایر گروه‌های مورد بررسی، واجد اختلاف معنی‌دار آماری بود (P≤۰/۰۵). همچنین، کمترین میزان فشار اسمزی نیز در گروه شاهد (۲۰ میلی مول بر لیتر تریس) ارزیابی شد (جدول ۴).

جدول ۴ـ اثر سطوح یون پتاسیم بر فشار اسمزی محلول‌های فعال‌کننده و دوره تحرک اسپرماتوزوآی ماهی بنی

سطوح متفاوت پتاسیم (میلی مول)	تحرک موجی شکل (ثانیه)	توقف ۹۵ درصد از سلول‌های اسپرماتوزوئید (ثانیه)	توقف کامل (ثانیه)	فشار اسمزی (میلی اسمول به کیلوگرم)
۰	۲۳±۱/۱۵^{a}	۴۸/۶۶±۲/۹۰^{c}	۵۸/۳۳±۴/۰۵^{c}	۳/۹±۰^{d}
۵۰	۲۶/۳۳±۱/۲۰^{a}	۹۲/۶۶±۶/۴۸^{a}	۱۱۴/۳۳±۵/۸۵^{a}	۱۹۴±۴/۷^{c}
۱۰۰	۱۲/۳۳±۱/۴۵^{b}	۶۵/۳۳±۳/۷۱^{b}	۷۳±۱/۷۳^{b}	۲۵۱±۱/۸^{b}
۱۵۰	۰^{c}	۰^{d}	۰^{d}	۳۹۷±۱/۴^{a}

۳ـ۴. اثر یون کلسیم بر پارامترهای حرکتی اسپرماتوزوآی ماهی بنی

بیشترین دوره تحرک موجی شکل اسپرماتوزوئیدهای ماهی بنی در غلظت ۲/۵ میلی مول بر لیتر از یون کلسیم دیده شد و کمترین این دوره در سطح ۷/۵ میلی مول بر لیتر از یون کلسیم به‌دست آمد. همچنین نتایج نشان داد که بین سطوح ۰/۵، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی مول بر لیتر یون کلسیم، اختلاف معنی‌دار آماری از لحاظ دوره توقف ۹۵ درصدی و توقف کامل سلول‌های اسپرماتوزوئید، وجود ندارد (P≥۰/۰۵). به‌علاوه ، بالاترین سطح فشار اسمزی در بین تیمارهای یون کلسیم، مربوط به غلظت ۱۰ میلی مول آن بود. همچنین کمترین سطح فشار اسمزی در بین تیمارهای مورد بررسی نیز به‌وسیله‌ی غلظت ۰/۵ میلی مول بر لیتر یون کلسیم ایجاد شد (جدول ۵).

جدول ۵ـ اثر سطوح یون کلسیم بر فشار اسمزی محلول‌های فعال‌کننده و دوره‌ی تحرک اسپرماتوزوآی ماهی بنی

سطوح متفاوت کلسیم (میلی مول)	تحرک موجی شکل (ثانیه)	توقف ۹۵ درصد از سلول‌های اسپرماتوزوئید (ثانیه)	توقف کامل (ثانیه)	فشار اسمزی (میلی اسمول به کیلوگرم)
۰/۵	۲۴/۳۳±۲/۶۰^{a,b}	۴۸/۶۶±۵/۵۳^{a}	۵۲/۶۶±۵/۳۶^{a}	۱±۰^{e}
۲/۵	۳۰/۶۶±۱/۲۰^{a}	۶۰/۶۶±۱/۸۵^{a}	۶۶/۶۶±۲/۰۲^{a}	۸/۷±۰/۶۷^{d}
۵	۲۱/۶۶±۰/۸۸^{a,b}	۴۳±۶/۰۲^{a}	۴۹/۳۳±۶/۳۳^{a}	۱۵±۱ ^{c}
۷/۵	۲۰±۲/۵۱^{b}	۴۳/۳۳±۸/۴۱^{a}	۵۰/۳۳±۹/۰۶^{a}	۲۱±۱/۲^{b}
۱۰	۲۶±۵/۵۶^{a,b}	۴۹/۶۶±۹/۸۲^{a}	۶۰±۱/۱۱^{a}	۳۴±۱/۵ ^{a}

۳ـ۵. اثر ساکاروز بر پارامترهای حرکتی اسپرماتوزوآی ماهی بنی

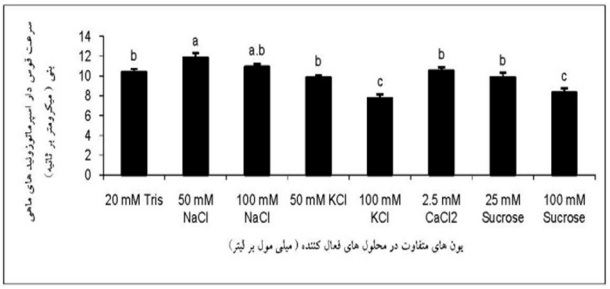
نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌دار آماری از لحاظ تحرک موجی شکل در سطوح ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مول ساکاروز وجود ندارد (P≥۰/۰۵). همچنین کلیه پارامترهای حرکتی سنجش شده در تحقیق، در سطح ۳۰۰ میلی مول بر لیتر ساکاروز، به صفر رسید. علاوه بر این، نتایج مشخص نمود که در مقایسه با سایر تیمارها، غلظت ۱۵۰ میلی مول بر لیتر ساکاروز، بالاترین دوره تحرک اسپرم ماهی بنی را ایجاد نموده است. همچنین، بالاترین فشار اسمزی مربوط به تیمار ۳۰۰ میلی مول بر لیتر ساکاروز و کمترین آن مربوط به گروه شاهد (۲۰ میلی مول در لیتر تریس) بود (جدول ۶).

جدول ۶ـ اثر سطوح ساکاروز بر فشار اسمزی محلول‌های فعال‌کننده و دوره تحرک اسپرماتوزوآی ماهی بنی

سطوح متفاوت ساکاروز (میلی مول)	تحرک موجی شکل (ثانیه)	توقف ۹۵ درصد از سلول‌های اسپرماتوزوئید (ثانیه)	توقف کامل (ثانیه)	فشار اسمزی (میلی اسمول به کیلوگرم)
۰	۲۳±۱/۱۵^{a}	۴۸/۶۶±۲/۹۰^{c}	۵۸/۳۳±۴/۰۵^{d}	۳/۹±۰ ±۰^{g}
۲۵	۲۴/۶۶±۰/۸۸^{a}	۵۸/۳۳±۶/۰۶^{b,c}	۷۳/۳۳±۶^{d}	۲۵±۱/۷ ^{f}
۵۰	۲۲/۳۳±۲/۶۰^{a}	۶۳/۶۶±۲/۴۰^{b,c}	۷۹/۳۳±۶/۸۳^{c,d}	۵۸±۱/۶^{e}
۱۰۰	۲۵/۳۳±۲/۴۰^{a}	۸۵±۵^{a,b}	۱۰۴±۷/۷۶^{b,c}	۱۰۲±۱/۴ ^{d}
۱۵۰	۳۱/۶۶±۵/۳۶^{a}	۱۱۲/۶۷±۱۱/۳۴^{a}	۱۳۱/۶۷±۱۴/۵۲^{a}	۱۷۹±۳/۴^{c}
۲۰۰	۲۴±۴/۵^{a}	۸۲/۳۳±۲۳/۷۷^{a,b,c}	۱۰۹±۱۲/۲۲^{a,b}	۲۱۱±۲ ^{b}
۳۰۰	.^{b}	.^{d}	.^{e}	۳۰۷±۴/۳^{a}

۳ـ۶. اثر ترکیبات یونی متفاوت بر سرعت قوس‌دار اسپرماتوزوآی ماهی بنی

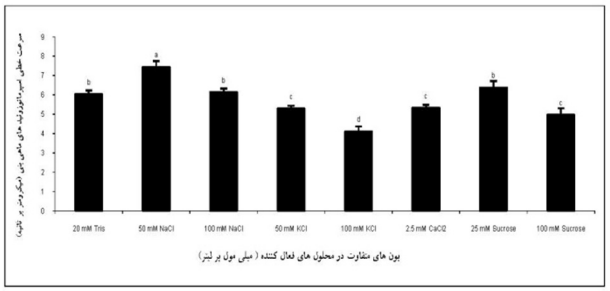
نتایج حاصل از آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که بالاترین سرعت قوس‌دار در سلول‌های اسپرماتوزوئید ماهی بنی با محلول حاوی ۵۰ میلی مول بر لیتر یون سدیم ایجاد شده است که دارای اختلاف معنی‌دار آماری با سایر تیمارهای مورد بررسی بود (P≤۰/۰۵). همچنین، تفاوت معنی‌دار آماری از لحاظ سرعت قوس‌دار اسپرماتوزوئیدها در محلول‌های ۲۰ میلی مول در لیتر تریس، ۵۰ میلی مول در لیتر پتاسیم، ۲/۵ میلی مول در لیتر کلسیم و ۲۵ میلی مول در لیتر ساکاروز وجود نداشت (P≥۰/۰۵). نتایج نشان داد که کمترین سرعت قوس‌دار در بین تیمارهای مورد بررسی نیز مربوط به تیمار ۱۰۰ میلی مول در لیتر یون پتاسیم و ۱۰۰ میلی مول در لیتر ساکاروز بود که این تیمارهای، اختلاف معنی‌داری را با همدیگر نشان ندادند (شکل ۱).



شکل ۱ـ اثر یون‌های متفاوت فعال‌کننده‌ها بر سرعت قوس‌دار اسپرماتوزوئید ماهی بنی (میکرومتر بر ثانیه)

۳ـ۷. اثر ترکیبات یونی متفاوت بر سرعت خطی اسپرماتوزوآی ماهی بنی

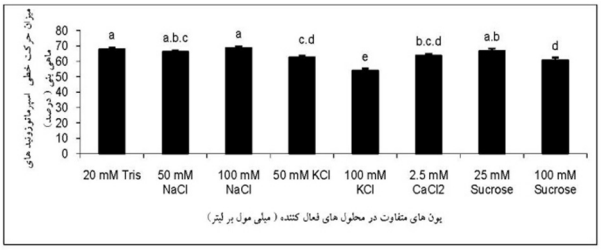
نتایج نشان داد که بالاترین میزان سرعت خطی سلول‌های اسپرماتوزوئید ماهی بنی در تیمار ۵۰ میلی مول در لیتر از یون سدیم، ارزیابی شده است (P≤۰/۰۵). همچنین اختلاف معنی‌داری از لحاظ سرعت خطی حاصل از تیمارهای ۲۰ میلی مول در لیتر تریس، ۱۰۰ میلی مول در لیتر یون سدیم و ۲۵ میلی مول در لیتر ساکاروز وجود نداشت (P≥۰/۰۵). به‌علاوه، کمترین سرعت خطی در اسپرماتوزوئیدهای ماهی بنی، در غلظت ۱۰۰ میلی مول در لیتر یون پتاسیم ارزیابی شد (شکل ۲).



شکل ۲– اثر یون‌های متفاوت فعال‌کننده‌ها بر سرعت خطی اسپرماتوزوئید ماهی بنی (میکرومتر بر ثانیه)

۳ـ۸. اثر ترکیبات یونی متفاوت بر درصد حرکت خطی اسپرماتوزوآی ماهی بنی

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بالاترین درصد حرکت خطی در اسپرماتوزوئیدهای ماهی بنی با تیمارهای ۲۰ میلی مول در لیتر تریس و ۱۰۰ میلی مول در لیتر یون سدیم ایجاد شده است و این تیمارها، با دیگر گروه‌های مورد مطالعه دارای اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۹۵ درصد بودند (P≤۰/۰۵). همچنین کمترین درصد حرکت خطی در اسپرماتوزوئیدهای ماهی بنی در غلظت ۱۰۰ میلی مول در لیتر یون پتاسیم ثبت شد (P≤۰/۰۵) (شکل ۳).



شکل ۳ـ اثر یون‌های متفاوت فعال‌کننده بر درصد حرکت خطی اسپرماتوزوئید ماهی بنی (درصد)

۴. بحث و نتیجه‌گیری

این تحقیق، اولین گزارش در خصوص سنجش اثر شرایط متفاوت یونی و اسمزی بر طول دوره تحرک، سرعت قوس‌دار، سرعت خطی و درصد حرکت خطی اسپرماتوزوآی ماهی بنی توسط نرم افزار Image J است. ارزیابی تحرک اسپرماتوزوآی ماهی بنی، نشان داد که طول دوره تحرک آن، مشابه سایر کپور ماهیان است. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که پارامترهای حرکتی اسپرم ماهی بنی، وابسته به شرایط یونی و اسمزی محلول‌های فعال‌کننده است. همچنین نتایج مشخص نمود که با افزایش غلظت یون‌های سدیم (سطح ۱۵ میلی مول بر لیتر)، پتاسیم (سطح ۱۵۰ میلی مول بر لیتر)، کلسیم (سطح ۱۰ میلی مول بر لیتر) و ساکاروز (سطح ۳۰۰ میلی مول بر لیتر)، سطح فشار اسمزی در محلول‌های مورد بررسی افزایش یافته است. با بررسی نتایج مشخص شد که در غلظت‌های بالای سدیم، پتاسیم و ساکاروز، افزایش بیش از حد فشار اسمزی محلول‌های مورد مطالعه، شرایطی مشابه پلاسمای منی را ایجاد نموده است که در این حالت، کلیه پارامترهای حرکتی اسپرماتوزوئید متوقف می‌شود (جداول ۳، ۴ و ۶). زمانی که دوره تحرک اسپرماتوزوآ در ماهیان آغاز می‌گردد، این دوره کمتر از ۱ دقیقه به طول می‌انجامد که این محدودیت زمانی، بدلیل تورم و تجزیه شدن اسپرماتوزوآها در محلول‌های نامناسب فعال‌کننده است (Cosoon et al., 1999; Cosson, 2004).

یافته‌های تحقیق حاضر مشخص نمود که مشابه اکثر ماهیان استخوانی آب شیرین، محلول‌های با فشار اسمزی بالا (غلظت‌های ۱۵۰ میلی مول بر لیتر سدیم و پتاسیم و ۳۰۰ میلی مول بر لیتر ساکاروز، جداول ۳، ۴ و ۶) از تحرک اسپرماتوزوآی ماهی بنی ممانعت به‌عمل می‌آورند، در حالی که در آزاد ماهیان و ماهیان خاویاری، میزان بالای یون پتاسیم ممانعت کننده تحرک اسپرماتوزوآ بوده و کاهش غلظت آن، سبب آغاز فعالیت اسپرماتوزوآ می‌شود (Cosson, 2004). همچنین یون پتاسیم در کپور ماهیان، سرعت و درصد تحرک سلول‌های اسپرماتوزوآ را افزایش می‌دهد و آغاز تحرک نیز با کاهش فشار اسمزی پلاسمای منی رخ می‌دهد (Billard and Cosson, 1992; Wilson-Leedy et al., 2009; Morisawa et al., 1983).

نتایج مربوط به سطوح متفاوت کلسیم بر تحرک اسپرم ماهی بنی مشخص نمود که بالاترین دوره‌ی تحرک در غلظت ۲/۵ میلی مول کلسیم در لیتر بوده و غلظت‌های بیشتر آن بر دوره تحرک اسپرم، اثر کاهنده داشته‌اند (جدول ۵). اثر ممانعت کنندگی یون کلسیم بر دوره تحرک در بعضی از ماهیان استخوانی دیگر نیز دیده شده است (Okuno and Morisawa, 1989; Zuccarelli and Ingermann, 2007).

به طور کلی می‌توان چنین استدلال نمود که سطوح متوسط یونی و اسمزی در محلول‌های مورد بررسی (غلظت ۱۰۰ میلی مول بر لیتر یون سدیم، ۵۰ میلی مول بر لیتر یون پتاسیم، ۲/۵ میلی مول بر لیتر یون کلسیم و ۱۵۰ میلی مول بر لیتر ساکاروز)، شرایط بهینه‌ای را برای تحرک اسپرماتوزوآی ماهی بنی فراهم نموده‌اند که خروج از این حالت بهینه، افت پارامترهای حرکتی را در اسپرم ماهی به‌دنبال دارد. در این رابطه، Wilson-Leedy و همکارن در سال (۲۰۰۹) نیز شرایط مشابهی را در ماهی *Danio rerio* گزارش نمودند. به‌نظر می‌رسد که در صورت عدم تعادل یونی و اسمزی محلول‌های فعال‌کننده، پارامترهای حرکتی اسپرم، به‌شدت تحت تاثیر قرار گیرد. در این خصوص، افت دوره تحرک اسپرم بر اثر به‌کارگیری محلول ۲ (جدول ۱ و ۲)، این امر را تائید

می‌کند. همچنین نتایج این تحقیق مشخص نمود که دوره حرکتی اسپرم توسط محلول ۲، از آب مقطر و آب کارگاه نیز کمتر است.

Alavi و همکارن، در سال (۲۰۱۰) گزارش نمودند که شرایط بهینه یونی (یون سدیم و پتاسیم) و اسمزی (ساکاروز) جهت فعالیت اسپرماتوزوآی ماهی بنی در محدوده ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی اسمول بر کیلوگرم بر کیلوگرم اتفاق می‌افتند. در حالی که نتایج تحقیق حاضر حاکی از آن است که با افزایش فشار اسمزی در محلول‌های حاوی ۱۵۰ میلی مول بر لیتر یون سدیم و پتاسیم، تحرک اسپرم ماهی بنی متوقف می‌شود که این امر بر خلاف نتایج Alavi و همکارن در سال (۲۰۱۰) است.

در این تحقیق غلظت بهینه یون پتاسیم (۵۰ میلی مول بر لیتر)، بالاترین طول دوره تحرک اسپرم را ایجاد کرده است. این امر نشان می‌دهد که در مقایسه با سایر تیمارهای یونی مطالعه شده، یون پتاسیم تاثیر بیشتری را بر طول دوره تحرک کل اسپرماتوزوآی ماهی بنی می‌گذارد که این امر منطبق با نتایج Morisawa و همکاران در سال ۱۹۸۳ است.

Alavi و همکاران نیز در سال (۲۰۰۹) عنوان نمودند با قرار گرفتن اسپرماتوزوئید ماهیان آب شور و شیرین، در معرض شوک اسمزی پائین (فعال سازی با آب مقطر)، ساختار تاژک آن شدیدا دستخوش تغییر می‌شود که این عامل سبب کاهش دوره‌ی تحرک و سرعت اسپرماتوزوئیدها خواهد شد. تحقیق حاضر نیز با تائید این امر، کاهش پارامترهای حرکتی اسپرم ماهی بنی را در غلظت‌های پائین سدیم، پتاسیم و ساکاروز نشان می‌دهد. همچنین کاهش درصد سلول‌های متحرک و دوره‌ی کل تحرک اسپرم به‌دلیل مصرف بیشتر ATP و کوتاهتر شدن ساختار تاژک اسپرماتوزوآ در فعال‌سازی اسپرم با آب مقطر است (Perchec et al., 1995). یافته‌های این پژوهش نشان داد که دوره تحرک اسپرماتوزوآی ماهی بنی، در محلول‌های نمکی بیشتر از آب مقطر است. در این خصوص Billard در سال (۱۹۹۲) و همچنین Kalbassi و Lorestani در سال (۲۰۰۷) عنوان نمودند که دوره‌ی تحرک اسپرماتوزوآ با استفاده از فعال‌کننده نمکی، طولانی‌تر بوده و این محلول‌ها، شرایط مناسب‌تری را جهت تحرک اسپرم ایجاد می‌نمایند.

در این تحقیق مشخص شد که یون سدیم در غلظت ۵۰ میلی مول بر لیتر، در مقایسه با سایر شرایط یونی و اسمزی مطالعه شده، بیشترین تاثیر را در افزایش سرعت قوس‌دار، سرعت خطی و درصد حرکت خطی اسپرماتوزوئیدهای ماهی بنی داشته است (شکل های ۱، ۲ و ۳). در این رابطه، Urbacheh و همکاران نیز در سال (۲۰۰۴) عنوان نمودند که فعال‌کننده‌های نمکی اسپرم سرعت حرکت اسپرماتوزوآ را افزایش می‌دهد. همچنین Comber Le و همکاران در سال (۲۰۰۴) گزارش نمودند که سرعت خطی اسپرماتوزوآها در فعال‌کننده‌های نامناسب اسپرم کاهش می‌یابد و در این خصوص، کاهش سرعت خطی اسپرماتوزوئیدهای ماهی بنی در سطح ۱۰۰ میلی مول بر لیتر یون پتاسیم، گویای این مطلب است.

نتایج تحقیق حاضر مشخص کرد که غلظت ۱۰۰ میلی مول در لیتر از یون پتاسیم در محلول‌های فعال‌کننده، کمترین سرعت خطی، سرعت قوس‌دار و درصد حرکت خطی را در بین سایر تیمارها سبب شده است. شاید یکی از دلایل این امر، فشار اسمزی بالای این محلول باشد که شرایط مناسبی در این فشار اسمزی برای تحرک اسپرماتوزوئیدها وجود ندارد (جدول۳ و شکل‌های ۱ تا ۳). نتایج نشان داد که فعال‌کننده‌های ترکیبی شماره ۴ و ۸ (جدول ۱)، بالاترین طول دوره‌ی تحرک اسپرم را در بین سایر محلول‌های ترکیبی ایجاد نموده است (جدول ۲). با ملاحظه جداول ۳، ۴ و ۶، مشاهده می‌شود که ترکیبات موجود در محلول‌های ۴ و ۸ در محدوده‌ی شرایط بهینه‌ی میزان سدیم، پتاسیم و ساکاروز، جهت فعالیت اسپرماتوزوآی ماهی بنی قرار دارند.

به‌عنوان جمع بندی نهایی می‌توان عنوان نمود که دوره‌ی تحرک اسپرماتوزوئیدهای ماهی بنی به شرایط یونی و اسمزی محلول‌های فعال‌کننده وابسته است. در این خصوص پیشنهاد می‌گردد که جهت ایجاد شرایط بهینه در پارامترهای حرکتی اسپرماتوزوئیدهای ماهی بنی به‌عنوان جایگزین آب کارگاه دشت آزادگان، از محلول فعال‌کننده با ترکیب ۵۰ میلی مول نمک، ۳۰ میلی مول کلرید پتاسیم و ۳۰ میلی مول تریس در لیتر و با فشار اسمزی ۱۸۹ میلی اسمول بر کیلوگرم استفاده شود.

۵. سپاسگزاری

از آقایان دکتر مغینمی ریاست محترم شیلات استان خوزستان و مهندس علی سواری ریاست محترم کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان بومی استان خوزستان به جهت فراهم آوردن شرایط لازم جهت انجام تحقیق حاضر تشکر و قدردانی می شود. همچنین از آقای دکتر Pavlov به جهت راهنمایی‌های ارزنده برای به‌کارگیری

نرم افزار Image J قدردانی می‌شود. به‌علاوه از آقای دکتر Brian Coad از موزه ماهی‌شناسی کانادا و آقای مهندس Al Mukhtar از دانشگاه بصره عراق به جهت راهنمایی‌های علمی تشکر می‌شود.

منابع

محمدیان، ت.؛ کوچنین، پ.؛ نیکو، س.؛ شیخ الاسلامی، م.؛ بیتا، س.؛ اسکندری، غ. ر.؛ ابهری سه گنبد، ح.، ۱۳۸۸. مقایسه تاثیر آنالوگ هورمون GnRH همراه با آنتی دوپامین دامپریدون (Ova-fact) به روش لینپه، با عصاره هیپوفیز ماهی کپور معمولی (CPE) بر شاخص‌های تولید مثلی ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*)، مجله دامپزشکی ایران. دوره پنجم، شماره ۲، صفحات ۷۰ تا ۸۰

Al Mukhtar, M.A.; Al Noor, S.S.; Saleh, J.H., 2006. General Reproductive Biology of Bunnei (*Barbus sharpeyi* Gunther, 1874) in Al Huwaizah Marsh, Basra-Iraq. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 6: 149-153.

Al Mukhtar, M.A.; Saleh, J.H.; Jaber, A.A.; Hatam, A., 2009. Artificial propagation and fingerlings production of *Barbus sharpeyi* (Gunther 1874) in basrah during the spring of 2006. Iraqi Journal of Agriculture, 14: 187-193.

Alavi, S.M.H.; Cosson, J., 2005. Sperm motility in fishes, effects of temperature and pH. Cell Biology International, 29: 101-110.

Alavi, S.M.H.; Jorfi, E.; Hatef, A.; Mortezavi, S.A.S., 2010. Sperm motility and seminal plasma characteristics in *Barbus sharpeyi* (Gu¨nther, 1874). Aquaculture Research, 41: 688-694.

Alavi, S.M.H.; Rodina, M.; Policar, T.; Kozak, P.; Penicka, M.; Linhart, O., 2007. Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. Theriogenology, 68: 276-283.

Alavi, S.M.H.; Rodina, M.; Viveiros, A.T.M.; Cosson, J.; Gela, D.; Boryshpolets, S.; Linhart, O., 2009. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). Theriogenology, 72: 32-43.

Bastami, K.D.; Imanpour, M.R.; Hoseinifar, S.H., 2009. Sperm of feral carp *Cyprinus carpio*: optimization of activation solution. Aquaculture International, 18: 771-776.

Billard, R., 1992. Reproduction in rainbow trout: Sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gamets. Aquaculture, 100: 263-298.

Billard, R.; Cosson, M.P., 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. Journal of Experimental Zoology, 261: 122-131.

Bobe, J.; Labbé, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. General and Comparative Endocrinology, 165 (3): 535-548.

Boryshpolets, S.; Dzyuba, B.; Rodina, M. L. P.; Hulak, M.; Gela, D.; Linhart O., 2009. Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Cryobiology, Volume 59: 291–296.

Bozkurt, Y., 2006. The relationship between body condition, sperm quality parameters and fertilization success in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Animal and Veterinary Advances, 5: 284-288.

Caille, N.; Rodina, M.; Kocour, M.; Gela, D.; Hans, F.M.; Linhart, O., 2006. Quantity, motility and fertility of tench *Tinca tinca* (L.) sperm in relation to LHRH analogue and carp pituitary treatments. Aquaculture International, 14:75–87.

Coad, B.W., 1995. Freshwater fishes of Iran. Acta Science, National Academy of Science Brno, 29 (1):1-64.

Coson, J., 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. Aquaculture International, Volume 12: 69-85.

diluent solutions on the duration of sperm motility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Agriculture Science and Natural Resources, 13 (6): 132-142.

Lahnsteiner, F.; Berger, B.; Weismann, T., 2003. Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. Theriogenology, 60: 829–841.

Le Comber, S.C.; Faulkes C.G.; Van Look, K.J. W.; Holt W.V.; Smith C., 2004. Recovery of sperm activity after osmotic shock in the three-spined stickleback: implications for pre-oviposition ejaculation. Behaviour, 141:1555–69.

Linhart, O.; Rodina, M.; Cosson, J., 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. Cryobiology, 41: 241–250.

Morisawa, M.; Suzuki, K.; Shimizu, H.; Morisawa, S.; Yasuda K., 1983. Effect of osmolality and potassiumon motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. Journal of Experimental Zoology, 107: 95-103.

Mylonas, C.C.; Fostier, A.; Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. General and Comparative Endocrinology, 165: 516-534.

Okuno, M.; Morisawa M., 1989. Effects of calcium on motility of rainbow trout sperm flagella demembranated with Triton X-100. Cell Motilty and the Cytoskeleton, 14: 194–200.

Park, I.S.; Choi, G.C.; Nam, Y.K.; Kim, D.S., 2002. The effect of exogenous hormone treatment on spermiation in *Rhynchocypris oxycephalus* (Sauvage and Dabry). Journal of World Aquaculture Society, 33:494-500.

Pavlov, D.A.; Emelyanova, N.G., 2006. Sperm motility in three coral reef fish species. Journal of Ichthyology, 46: 465–475.

Cosson, J.; Billard, R.; Gibert, C.; Dreanno, C.; Suquet, M., 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In the male gamete. From basic to clinical application, C. Gagnon, (Ed). Cache Rive Press: 161-186.

Cejko, B.; Kowalski, R.K.; Kucharczyk, D.; Zarski, D.; Targonska, K.; Glogowski, J., 2011. Effect of time after hormonal stimulation on semen quality indicators of common carp, *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae). ACTA Ichthyology et Pisccatoria, 41: 75-80.

Emri, M.; Marian, T.; Tron, L.; Balkay, L.; Krasznai, Z., 1998. Temperature adaptation changes ion concentrations in spermatozoa and seminal plasma of common carp without affecting sperm motility. Aquaculture, 167: 85–94.

Eschmeyer, W.N., (ed.) 1999. Catalog of fishes. Updated database version of November 1999. Catalog databases as made available to FishBase in November 1999.

Fauvel, C.; Suquet, M.; Cosson, J., 2010. Evaluation of fish sperm quality. Journal of Applied Ichthyology, 26: 636–643.

Horvath, A.; Miskolczi, E.; Mihalffy, S.; Osz, K.; Szabo, K.; Urbanyi, B., 2007. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. Cryobiology 54:251–257.

Hu, J.; Zhang, Y.; Zhou, R.; Zhang, Y., 2009. Changes in extracellular osmolality initiate sperm motility in freshwater teleost rosy *Barb puntius* conchonius. Theriogenology, 72: 704–710.

Kahkesh, F.B.; Yooneszadeh Feshalami, M.; Amiri, F.; Nickpey, M., 2010. Effect of Ovaprim, Ovatide, HCG, LHRH-A2, LHRHA2+CPE and Carp Pituitary in Benni (*Barbus sharpeyi*) Artificial Breeding. Global Veterinaria, 5: 209-214.

Kalbassi, M.R.; Lorestani, R., 2007. Effect of diffrnt

(*Salvelinus alpinus*). Behavioral Ecology and Sociobiology, 57: 438-444.

Utarabhand, P.; Watanakui, V., 1998. Effects of ion content and pH medium on motility of tilapia (*Oreochromis niloticus*) sperm. Journal of Sciences Society Thailand, 24: 1-10.

Warnecke, D.; Pluta, H.J., 2003. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. Aquaculture, 215: 167–185.

Wilson-Leedy, J.G.; Ingermann, R.L., 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. Theriogenology, 67: 661–672.

Wilson-Leedy, J.G.; Kanuga, M.K.; Ingermann, R.L., 2009. Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. Theriogenology, 71: 1054–1062.

Yousefian, M.; Goli, G.H.; Hedayatifard, M., 2008. Induction of ovulation in endemic *Chalcarburnus chalcoides*, living in the Caspian Sea, using LHRH-a combined with metoclopramide. African Journal of Biotechnology, 7: 4199-4201.

Zohar, Y.; Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture, 197: 99–136.

Zuccarelli, M.D.; Ingermann, R.L., 2007. Calcium induced quiescence of sperm motility in the bluegill (*Lepomis macrochirus*). Journal of Expremental Zoology, 30::590–599.

Pavlov, D.A., 2006. A method for the assessment of sperm quality in fish. Journal of Ichthyology, 46: 391-398.

Perchec, G.; Jeulin, C.; Cosson, J.; Andre, F.; Billard, R., 1995. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. Journal of Cell Science, 108: 747-753.

Podhorec, P.; Kouril, J., 2009. Induction of final oocyte maturation in Cyprinidae fish by hypothalamic factors: a review. Veterinarni Medicina, 54: 97–110.

Psenicka, M.; Rodina, M.; Flajshans, M.; Kaspar, V.; Linhart, O., 2009. Structural abnormalities of common carp *Cyprinus carpio* Spermatozoa. Fish Physiology and Biochemistry, 35: 591–597.

Pyka, J.; Bartel, R.; Szczerbowski, J.A.; Epler, P., 2001. Reproduction of gattan (*Barbus xanthopterus* Heckel), shabbout (*Barbus grypus* Heckel) and bunni (*Barbus sharpeyi* Gunther) and rearing stocking material of theses species. Archives Polish Fisheries, 9: 235-246.

Rosengrave, P.; Taylor, H.; Montgomerie, R.; Metcalf, V.; McBride, K.; Gemmell, N.J., 2008. Chemical composition of seminal and ovarian fluids of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their effects on sperm motility traits. Comparative Biochemistry and Physiology, 152: 123-129.

Silla, A.J., 2011. Effect of priming injections of luteinizing hormone-releasing hormone on spermiation and ovulation in Günther's Toadlet, *Pseudophryne guentheri*. Reproductive Biology and Endocrinology, 9: 1-9.

Urbacheh, D.; Folstad, I.; Rudolfsen, G., 2004. Effects of ovarian fluid on sperm velocity in Arctic charr