

شاخص‌های تولید مثلی جنس نر ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii*) ساکن در رودخانه قشلاق سندج

تهمینه فتح الهی^۱، وحید زادمجید^{۱*}، برزان بهرامی کمانگر^۱

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، صندوق پستی: ۴۱۶

تاریخ دریافت: ۲۹ خرداد ۱۳۹۶

تاریخ پذیرش: ۱۵ آبان ۱۳۹۶

چکیده

ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii*) گونه‌ای بومی دریای خزر است که به تازگی به دریاچه سد قشلاق سندج پیوند خورده است. در تحقیق حاضر به منظور بررسی تاثیر تغییر زیستگاه بر ویژگی‌های تولیدمثلی این گونه، شاخص‌های تولید مثلی جنس نر شامل پارامترهای کیفی اسپرم، آنزیم‌های پلاسمای سمینال، شاخص گنادوسوماتیک (GSI)، استروئیدهای جنسی و بافت شناسی گناد ماهی سفید دریای خزر ساکن در رودخانه قشلاق سندج (با متوسط وزن ۱۳۳/۴۱ گرم و متوسط سن ۲/۱ سال) در طی فصل تولیدمثل طبیعی (فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۴) بررسی شد. مقادیر شاخص‌های زیستی اسپرم شامل: حجم، طول دوره تحرک، تراکم، اسپرماتوکریت، پی-اچ و اسمولاریته پلاسمای سمینال به ترتیب شامل $2/41 \pm 0/16$ میلی‌لیتر، $42/46 \pm 1/07$ ثانیه، $17/31 \pm 2/24$ میلیون سلول در هر میلی‌متر مکعب، $40/8 \pm 2/34$ درصد و $282/1 \pm 4/87$ میلی‌اسمول بر کیلوگرم تعیین گردید. همچنین متوسط شاخص گنادوسوماتیک در نمونه‌های مورد بررسی $5/71 \pm 0/31$ تعیین گردید. یون‌های سدیم، کلراید و پتاسیم در پلاسمای سمینال بعنوان یون‌های غالب تعیین گردیدند. غلظت آنزیم‌های آسپارات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز در پلاسمای سمینال به ترتیب $48/7 \pm 7/29$ واحد در لیتر، $16/92 \pm 1/57$ واحد در لیتر و $25/4 \pm 1/97$ واحد در لیتر تعیین شد. غلظت تستوسترون و دی‌هیدروکسی‌پروژسترون در نمونه‌های سرم به ترتیب $1/23 \pm 0/24$ نانوگرم در میلی‌لیتر و $0/16 \pm 0/04$ نانوگرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شدند. تصاویر بافت‌شناسی گناد حضور غالب اسپرماتوزوآ در بافت گناد نمونه‌های مورد بررسی را نشان داد که می‌تواند حاکی از ورود بافت بیضه به مرحله ریزش اسپرم (اسپرمیشن) باشد. مقایسه با نتایج فلاح شمسی در رودخانه سفید رود و تفاوت آن با نتایج این تحقیق گویای تاثیر زیستگاه می‌باشد. ولی بطور کلی زیستگاه اثر سوئی بر توان تولید مثلی جنس نر ماهی سفید دریای خزر ساکن در دریاچه سد قشلاق سندج نداشته است.

کلمات کلیدی: ماهی سفید دریای خزر، رودخانه قشلاق سندج، بیضه، اسپرم، استروئیدهای جنسی.

مقدمه

مطالعه روی بیولوژی اسپرم (که جزئی از بیولوژی تکثیر در ماهیان می‌باشد) در قرن نوزدهم میلادی شروع شد و به تدریج گسترش یافت (Billard and Cosson, 1992). بررسی کیفیت اسپرم در ماهیان نر می‌تواند به مدیریت سلامت ژنتیکی مولدین به کار رفته کمک کند (Tekin et al., 2003). برای این کار می‌بایست شاخص‌های زیستی اسپرم (اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، اسیدیته، اسمولالیتی، ترکیبات شیمیایی پلاسمای سمینال، طول دوره حرکت اسپرم و درصد اسپرم‌های متحرک) که مستقیماً روی توانایی لقاح اسپرم موثرند مشخص شود (Rurangwa et al., 2004). در آبی‌پروری مدرن، ارزیابی کیفیت اسپرم یکی از تحقیقات کاربردی و جالب جهت سنجش لقاح مصنوعی می‌باشد (Aas et al., 1991; Mylonas et al., 2016). پلاسمای سمینال محیطی را برای تغذیه، حفاظت و تکامل اسپرماتوزوآ بوجود می‌آورد که خود توسط بیضه و لوله‌های اسپرم بر ساخته می‌شود. در پستانداران ترکیبات پلاسمای سمینال به خوبی مطالعه شده است اما مطالعه روی ترکیبات سمن در ماهیان در دهه‌های اخیر شروع شده است. پلاسمای سمینال شامل ترکیبات غیرآلی (یون‌ها) ترکیبات آلی و آنزیم می‌باشد. ترکیبات غیرآلی شامل یون‌های سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم است، که نقش ممانعت کننده و تحریک کننده حرکت در اسپرماتوزوآ را دارند و ترکیبات آلی به فعالیت‌های متابولیسمی اسپرماتوزوآ دلالت دارد (شیدایی و همکاران، ۱۳۹۱؛ Rurangwa et al., 2004; Verma et al., 2009). از آنجاییکه آگاهی از ترکیبات پلاسمای سمینال و دیگر مایعات زیست‌شناختی، می‌تواند در تولید محیط نگهدارنده

تخمک و رقیق‌کننده‌ها برای افزایش طول دوره نگهداری و فعالیت اسپرم مفید باشد و فراگیری دانش جدید در مورد جنبه‌های مختلف بیولوژی سمن و نگهداری آن از فاکتورهای مهم کنترل کننده فرآیند لقاح مصنوعی در ماهیان پرورشی و حفاظت بیولوژیک در گونه‌های دیگر جانوری است. مطالعه و شناخت سطوح هورمونی در ماهیان یکی از مهمترین عوامل تشخیص ساز و کار درگیر و تنظیم کننده فرایند تولیدمثل در آن‌ها بوده، که دستیابی به سطوح این تغییرات در ماهیان وحشی و پرورشی دارای اهمیت است. غدد جنسی دو جنس نر و ماده، استروئیدهایی ترشح می‌کنند که در بروز صفات ثانویه جنسی و تولید گامت نقش دارند. استروئیدهای جنسی نظیر استروژن، آندروژن و پروژسترون به طور پیچیده‌ای در بلوغ و کنترل رفتارهای جنسی دخالت دارند (Scott et al., 2010).

ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii*) گونه بومی دریای خزر است و بیشترین جمعیت این گونه در سواحل جنوبی دریای خزر یعنی سواحل منتهی به کشور ایران دیده شده است (رضوی صیاد، ۱۳۷۴). با توجه به کاهش صید ماهی سفید از دریای خزر به جهت عوامل مختلف از جمله صید بی‌رویه، از بین رفتن مکان‌های تخم‌ریزی طبیعی و آلودگی‌های زیست محیطی، تفکر تکثیر مصنوعی ماهی سفید قوت یافت (ولی پور و خانی‌پور، ۱۳۹۴). به طوری که در دهه ۱۳۴۰ برای اولین بار تکثیر تحقیقاتی این ماهی توسط فرید پاک، در چندین رودخانه‌ی حوزه جنوبی دریای خزر از جمله شلمان رود و شفارود به انجام رسید. پس از آن تکثیر و رهاسازی این ماهی در دستور کار سالیانه بازسازی ذخایر سازمان شیلات ایران قرار گرفت.

به عنوان مثال مطالعه صورت گرفته توسط Fallah Shamsi و Khara (۲۰۱۵) نشان داد که پارامترهای اسپرم‌شناختی بین مولدین ۳ و ۴ ساله اختلافی ندارد در صورتی که برخی از پارامترهای بیوشیمیایی پلاسمای سمینال مانند فشار اسمزی، در مولدین مسن‌تر بالاتر می‌باشد. تغییر در زیستگاه این گونه از دریای خزر به دریاچه سد قشلاق سنندج می‌تواند بر روند چرخه تولیدمثل این گونه اثرگذار باشد. لذا با توجه به ارزش اقتصادی بالا از یک طرف و از طرف دیگر بررسی امکان بلوغ این گونه در منابع آب‌های داخلی، هدف اصلی این پژوهش بررسی شاخص‌های تولیدمثلی جنس نر ماهی سفید دریای خزر ساکن در سد قشلاق سنندج به منظور پی بردن به امکان بلوغ در آب‌های داخلی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

صید مولدین

طی ماه‌های فروردین تا اردیبهشت ۱۳۹۴ یعنی در اوج فصل رسیدگی جنسی با استفاده از تور پرتابی (سالیک) ۲۰ نمونه مولد نر ماهی سفید با طول و وزن یکسان (جدول ۱) از رودخانه چهل‌گزی که جزو حوزه آبریز رودخانه قشلاق سنندج می‌باشد صید گردید. درجه حرارت آب رودخانه در طی جمع‌آوری ماهیان ۱۳ درجه سانتی‌گراد بود. ماهیان جمع‌آوری شده از لحاظ ظاهری بررسی شدند و فاقد هر گونه زخم و ناهنجاری‌های ظاهری بودند. ماهیان صید شده واجد برجستگی‌های مرواریدی شکل بر روی سر بودند. بنابراین فقط مولدین واجد برجستگی‌های مرواریدی بر روی سر در این تحقیق استفاده گردید.

بچه‌ماهیان انگشتقد این گونه برای اولین در سال ۱۳۸۶ به منظور افزایش ذخایر ماهی پشت سد قشلاق سنندج به این حوزه آبی معرفی گردید. در طی سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۸ براساس مجوز صادره از سازمان شیلات ایران، دویست هزار قطعه بچه ماهی پنج گرمی از طریق اداره شیلات استان کردستان خریداری و به این منبع آبی معرفی گردید (Bahrami Kamangar et al., 2012). ماهی سفید گونه غیربومی در آب‌های استان کردستان می‌باشد. در رابطه با پیوند ماهیان غیربومی به منابع آبی در صورت امکان تولیدمثل و بازماندگی می‌تواند اثرات محیطی متفاوت، گاه مثبت و گاه منفی بر بوم‌سازگان آبی داشته باشد. با توجه به ارزش اقتصادی ماهی سفید، پیوند آن به دریاچه سد قشلاق می‌تواند اثرات مثبتی داشته باشد (Bahrami Kamangar et al., 2012).

رسیدگی جنسی در ماهیان تحت تاثیر عوامل محیطی مختلف از جمله دما، طول دوره تابش نور، شوری آب و عوامل مختلف دیگری می‌باشد. تغییر در شدت این عوامل می‌تواند منجر به اثرات نامطلوب بر روند تولیدمثل ماهیان گردد (Billard and Breton, 1978). نقش فاکتورهای محیطی بر تولیدمثل ماهی سفید مطالعه شده است. بطوریکه Khara و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند که بالاترین هم‌آوری نسبی، قطر تخمک و درصد لقاح در ماهی سفید مهاجر به رودخانه شیرود در دمای ۱۵/۹۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد، در صورتی که وزن گناد و هم‌آوری مطلق در دمای ۱۷/۷۴ بالاتر بود. همچنین بیولوژی اسپرم ماهی سفید بین سنین مختلف و زیستگاه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (Golpour et al., 2015; Fallah Shamsi and Khara, 2015; Bavand Savadkouhi; Khara, 2017؛ باوند سوادکوهی و همکاران، ۱۳۹۱).

زیست‌سنجی مولدین

طول کل و طول استاندارد (سانتی‌متر) مولدین نر (۲۰ نمونه) بوسیله تخته بیومتری و وزن کل (گرم) آنها توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری و در دفترچه بیومتری ثبت شد. جهت تعیین سن ماهیان با استفاده از روش فلس خوانی تعدادی فلس از قسمت میانی بدن ماهی بین باله پشتی و سینه‌ای برداشته شد و در آزمایشگاه با استفاده از لوپ چشمی نیکون تعیین سن صورت گرفت (Biswas, 1993).

اسپریم‌گیری و سنجش پارامترهای اسپرم شناختی و بیوشیمیایی پلاسمای اسپرمی

برای جمع‌آوری اسپرم، بعد از خشک کردن منفذ تناسلی بدون اختلاط با آب یا ادرار، با فشار ملایم به ناحیه شکمی از ماهیان مولد نر در محل صید اسپرم‌گیری به عمل آمد. اسپرم‌های جمع‌آوری شده در کنار یخ در فاصله زمانی یک ساعت جهت آنالیز پارامترهای کیفی به آزمایشگاه منتقل شدند. تعیین حجم اسپرم (میلی‌لیتر) توسط سرنگ‌های ۱ میلی‌لیتر انسولین صورت گرفت. برای اندازه‌گیری طول دوره حرکت اسپرم (ثانیه)، زمان تحرک از لحظه فعال شدن توسط محلول فعال‌کننده (NaCl, 50 mM; Tris, 20 mM, pH 8.5) به نسبت ۱:۲۰۰۰ تا زمانی که همه اسپرم‌ها از حرکت باز ایستادند توسط میکروسکوپ متصل به دوربین (Eclipse E200-LED) اندازه‌گیری شد و مشاهدات در دمای اتاق (۲۰ تا ۲۲ سانتی‌گراد) صورت گرفت (Alavi et al., 2007). برای اندازه‌گیری اسپرماتوکریت (درصد)، پس از سانتریفیوژ کردن اسپرم در دستگاه سانتریفیوژ با ۶۰۰۰ دور در ۸ دقیقه در لوله‌های موئینه با استفاده از هماتوکریت خوان

(LABTRON CO. Behdad, Iran)، درصد اسپرم به پلاسمای سمینال اندازه‌گیری شد. تراکم اسپرم نیز به روش استاندارد هماسیتومتری اندازه‌گیری شد و با واحد میلیون در هر میلی‌متر مکعب سمن محاسبه شد (Butts et al., 2012). جهت اندازه‌گیری پی‌اچ و فشار اسمزی پلاسمای سمینال (میلی‌اسمول بر کیلوگرم)، نمونه‌ها درون ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد، با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (Eppendorf 5810 R, Germany) شدند. بعد از سانتریفیوژ، پلاسمای سمینال که در بخش بالای ویال قرار دارد به درون ویال‌های جدید انتقال داده و پی‌اچ و فشار اسمزی پلاسمای سمینال بلافاصله پس از پایان سانتریفیوژ به ترتیب به بوسیله دستگاه پی‌اچ‌متر (Metrohm Ltd. CH-9101 Herisau, Switzerland) و اسمومتر (model K-7000; KNAUER, Germany) اندازه‌گیری شد. مقادیر یون‌های کلراید، منیزیم، کلسیم، ترکیبات آلی (گلوکز، تری‌گلیسرید، کلسترول، پروتئین کل و اوره) و آنزیم‌های پلاسمای سمینال (AST, ALT, ALP) با دستگاه اسپکتروفتومتر و کیت‌های شرکت پارس آزمون طبق روش ارائه شده در راهنمای استفاده از کیت‌ها اندازه‌گیری شد. سنجش یون‌های سدیم و پتاسیم با استفاده از دستگاه جذب اتمی صورت گرفت. برای این کار ابتدا میزان جذب شعله تحت تاثیر غلظت‌های مختلف استاندارد خوانده شد و توسط نرم‌افزار Excel معادله رگرسیونی آن ترسیم و غلظت‌های سدیم و پتاسیم در پلاسمای اسپرمی محاسبه شد.

شاخص گنادوسوماتیک معیاری جهت اندازه‌گیری میزان رشد گندهای مولدین (نر و ماده) نسبت به وزن کل بدن می‌باشد که از طریق فرمول زیر محاسبه گردید.

$$GSI = \frac{\text{وزن گناد (گرم)}}{\text{وزن بدن (گرم)}} \times 100$$

سنجش استروئیدهای جنسی

استروئیدهای جنسی (تستوسترون و دی‌هیدروکسی پروژسترون) به روش الایزا (ELISA)^۱ و با استفاده از کیت‌های سنجش هورمونی شرکت IBL (International GmbH, Germany) در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و داده‌های بدست آمده بصورت نانوگرم بر میلی‌لیتر ارائه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به دست آمده در ارتباط با پارامترهای کیفی اسپرم، آنزیم‌های پلاسمای سمینال، شاخص گنادوسوماتیک و استروئیدهای جنسی توسط آزمون T-test تک نمونه‌ای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها و عملیات مربوط به وسیله نرم‌افزار spss انجام شد (SPSS 16, Chicago, IL). داده‌ها در نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار استاندارد (Mean $\pm$ S.D) بیان شده است.

نتایج

نتایج بیومتری مولدین نر ماهی سفید دریای خزر ساکن در رودخانه قشلاق سنجش نشان داد که متوسط

خونگیری، تعیین شاخص گنادوسوماتیک (GSI) و بافت شناسی بیضه

پس از اسپرم‌گیری، ماهیان با گل میخک به میزان ۱۵۰ ppm بیهوش شدند. در ادامه سطح بدن ماهیان کاملاً با استفاده از یک پارچه تمیز خشک گردید. خونگیری از ماهیان توسط سرنگ از ناحیه ساقه دمی صورت گرفت. نمونه‌های خون، یک ساعت پس از لخته شدن با استفاده از سانتریفیوژ (۱۵ دقیقه با ۳۰۰۰ g و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) سرم از خون تفکیک شد (Zadmajid, 2016). سپس سرم به ویال‌هایی که مشخصات مربوطه به ماهی توسط برجسب روی آن نصب شده انتقال داده شد و ویال یاد شده در دمای زیر انجماد (۲۱- درجه سانتی‌گراد) تا زمان آنالیز استروئیدهای جنسی نگهداری شدند. شاخص گنادوسوماتیک طبق فرمول زیر محاسبه گردید. جهت بررسی بافت بیضه، با استفاده از شکافتن ناحیه شکمی ماهیان بیضه‌ها استخراج گردید و پس از تعیین شاخص گنادوسوماتیک، از قسمت‌های میانی و انتهای بافت بیضه نمونه‌گیری بعمل آمد. در ادامه نمونه‌های بافتی فیکس شده در محلول بوئن پس از مراحل آبگیری و شفاف‌سازی در پارافین قرار داده شد و مقاطع بافتی ۴ میکرومتری توسط دستگاه میکروتوم (DS 8402, DID SABZ CO. Iran) تهیه شد. پس از برش، با هماتوکسیلین-انوزین رنگ آمیزی شد و از تمام نمونه‌های گناد در آزمایشگاه ۳ تا ۵ عدد لام تهیه شد و اسلایدهای بافتی به کمک میکروسکوپ نوری مجهز به مانیتور بررسی و مراحل تکامل و ساختار سلولی براساس روش ارائه شده توسط Blazer (۲۰۰۰) تعیین گردید.

¹ Enzyme-linked-Immunosorbent Assays

سن مولدین صید شده ۲/۱ سال بود (جدول ۱). مقادیر پارامترهای زیستی اسپرم مولدین ماهی سفید دریای خزر ساکن در رودخانه قشلاق سنندج در جدول ۲ نشان داده شده است. مقادیر ترکیبات یونی پلاسمای سمینال (جدول ۳) مولدین ماهی سفید دریای خزر ساکن در رودخانه قشلاق سنندج نشان داد که یون‌های سدیم ($190/87 \pm 3/51$ میلی‌اکی والان در لیتر)، کلراید ($124/6 \pm 0/95$ میلی‌اکی والان در لیتر) و پتاسیم ($28/34 \pm 1/47$ میلی‌اکی والان در لیتر) یون‌های غالب

پلاسمای سمینال بودند. مقادیر ترکیبات آلی پلاسمای سمینال در جدول ۴ نشان داده شده است که براساس نتایج پروتئین کل بیشترین ترکیب آلی پلاسمای سمینال و کمترین مقدار هم مربوط به گلوکز بود. مقادیر آنزیم‌های پلاسمای سمینال در جدول ۵ گزارش شده است همچنین مقایسه استروئیدهای جنسی سرم خون نشان داد که گامت در مرحله کاملاً رسیده قرار داشت (جدول ۶).

جدول ۱: نتایج بیومتری مولدین نر ماهی سفید دریای خزر (۲۰ نمونه) ساکن در رودخانه قشلاق سنندج

ویژگی‌های زیستی	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف از معیار
سن (سال)	۲ ⁺	۳ ⁺	۲/۱	۰/۱
طول استاندارد (سانتی‌متر)	۱۹	۲۸	۲۲/۵	۰/۸۶
وزن کل (گرم)	۷۹/۷۳	۲۶۱/۴۱	۱۳۳/۴۱	۱۷/۴۲
وزن گناد (گرم)	۵/۲	۹/۸۸	۷/۱۶	۰/۵
شاخص گنادوسوماتیک (درصد)	۳/۷۸	۷/۸۸	۵/۷۱	۰/۳۷

جدول ۲: ویژگی‌های زیستی اسپرم مولدین ماهی سفید دریای خزر (۲۰ نمونه) در رودخانه قشلاق سنندج

ویژگی‌های زیستی اسپرم	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف از معیار
حجم اسپرم (میلی‌لیتر)	۱/۵	۳/۲	۲/۴۱	۰/۱۶
طول دوره تحرک (ثانیه)	۳۷	۴۶/۵	۴۲/۴۶	۱/۰۷
تراکم (تعداد سلول $\times 10^6$ / میلی‌متر مکعب)	۱۴/۱۲	۲۳/۷۵	۱۷/۳۱	۲/۵
اسپرماتوکریت (درصد)	۳۰/۷۵	۴۹/۶۶	۴۰/۸۱	۲/۳۴
فشار اسمزی (میلی‌اسمول/کیلوگرم)	۲۵۹	۳۰۱	۲۸۲/۱	۴/۸۷
بی‌اچ	۷/۷۹	۷/۹۱	۷/۷۹	۰/۰۲

جدول ۳: ترکیبات یونی پلاسمای سمینال مولدین ماهی سفید دریای خزر (۱۱ نمونه) در رودخانه قشلاق سنندج

ترکیبات یونی پلاسمای سمینال	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف از معیار
سدیم (میلی‌اکی والان/لیتر)	۱۷۶/۸۵	۲۱۴/۳۶	۱۹۰/۸۷	۳/۵۱
کلراید (میلی‌اکی والان/لیتر)	۱۲۰/۴۳	۱۲۹/۳۱	۱۲۴/۶	۰/۹۵
پتاسیم (میلی‌اکی والان/لیتر)	۱۹/۳۳	۳۳/۵۳	۲۸/۳۴	۱/۴۷
کلسیم (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۱/۱۶	۱/۸۱	۱/۶۲	۰/۰۷
منیزیم (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۱/۵۶	۳/۱۳	۲/۲۸	۰/۱۷

جدول ۴: ترکیبات آلی پلاسمای سمینال مولدین ماهی سفید دریای خزر (۱۱ نمونه) در رودخانه قشلاق سندج

ترکیبات آلی پلاسمای منی	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف از معیار
گلوکز (میلی گرم/دسی لیتر)	۰/۹۵	۱/۶۵	۱/۳۲	۰/۰۷
تری گلیسرید (میلی گرم/دسی لیتر)	۲۹/۴۵	۴۵/۸۷	۳۸/۴۲	۱/۸
کلسترول (میلی گرم/دسی لیتر)	۲۱/۴	۲۶/۵۶	۲۳/۸	۰/۵۸
پروتئین کل (گرم/دسی لیتر)	۰/۳۶	۰/۶۶	۰/۴۸	۰/۰۳
اوره (میلی گرم/دسی لیتر)	۱۰/۴۸	۱۶/۶	۱۳/۰۳	۰/۶۸

جدول ۵: آنزیم‌های پلاسمای سمینال مولدین ماهی سفید دریای خزر (۱۱ نمونه) در رودخانه قشلاق سندج

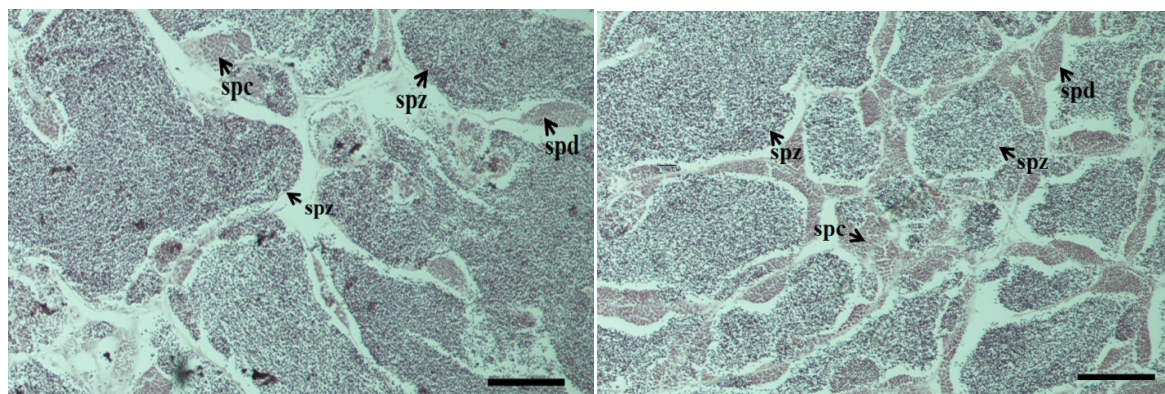
آنزیم‌های پلاسمای سمینال	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف از معیار
AST (واحد/لیتر)	۱۹/۵۷	۹۱/۳۱	۴۸/۷	۷/۲۹
ALT (واحد/لیتر)	۱۰/۵۴	۲۵	۱۶/۹۲	۱/۵۷
ALP (واحد/لیتر)	۱۴/۴۱	۳۱/۴۳	۲۵/۴	۱/۹۷

جدول ۶: استروئیدهای جنسی نر سرم خون مولدین ماهی سفید دریای خزر (۱۰ نمونه) در رودخانه قشلاق سندج

استروئیدهای جنسی	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف از معیار
تستوسترون (نانو گرم/میلی لیتر)	۰/۵	۲/۹	۱/۲۳	۰/۲۴
دی‌هیدروکسی پروژسترون (نانو گرم/میلی لیتر)	۰/۰۱	۰/۳۴	۰/۱۶	۰/۰۴

هستند و پراکنش سلول‌های اسپرماتوزآ بالاتر می‌باشد. وجود سلول‌های اسپرماتوزآ در مجاری لومن نشان دهنده شروع مرحله اسپرمیشن می‌باشد.

مطالعات بافت شناسی بیضه نشان داد که سلول‌های جنسی در مراحل مختلف رشد در بافت بیضه قابل رویت هستند بطوریکه سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتید و اسپرماتوزآ در مجاری لومن قابل رویت



شکل ۱: بافت گناد نر ماهی سفید دریای خزر ساکن رودخانه قشلاق سندج با بزرگ‌نمایی $\times 400$: spc: اسپرماتوسیت، spd: اسپرماتید. Spz: اسپرماتوزآ. (۱۰۰ میکرومتر).
 Spz: اسپرماتوزآ.

بحث

به منظور بررسی کیفیت اسپرم مولدین ماهی سفید دریای خزر ساکن در رودخانه قشلاق سنندج و اثر زیستگاه بر ویژگی‌های تولیدمثلی مولدین نر، به مقایسه این ویژگی‌ها در مولدین رودخانه قشلاق سنندج با مولدینی که در دریای خزر زیست کرده و برای تخم‌ریزی به رودخانه سفیدرود مهاجرت کرده می‌پردازیم، زیرا رودخانه‌ی قشلاق سنندج از سرشاخه‌های رودخانه سفیدرود می‌باشد. فلاح شمسی و همکاران، (۱۳۹۰) گزارش کردند که طول دوره تحرک اسپرم، تراکم، اسپرماتوکریت، پی‌اچ و اسمولاریته پلاسمای سمینال در مولدین مولدین صید شده از رودخانه سفیدرود به ترتیب ۶۳/۹۹ ثانیه، ۱۸/۰۲ میلیون سلول در میلی‌متر مکعب، ۴۵/۵ درصد، ۷/۷ و ۳۲۶/۵ میلی‌اسمول بر کیلوگرم بود، که تمامی ویژگی‌های زیستی اسپرم در جمعیت ماهی سفید رودخانه قشلاق سنندج کمتر از سفیدرود می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط باوند سوادکوهی و همکاران (۱۳۹۱) به منظور ارزیابی اثر سن بر ویژگی‌های زیستی اسپرم، درصد لقاح و میزان ظهور لارو ماهی سفید دریای خزر انجام شد به این نتیجه رسیدند که تفاوت معناداری در ویژگی‌های زیستی اسپرم در بین مولدین نر ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ ساله وجود ندارد یعنی سن اثری بر ویژگی‌های زیستی اسپرم نداشته است، اما بیشترین درصد لقاح و ظهور لارو برای مولدین ۴ ساله بود. همچنین نتایج تحقیق Khara و Bavand Savadkouhi (۲۰۱۷) نشان داد که اختلاف معنی‌داری در ویژگی‌های اسپرم ماهی سفید مهاجر به رودخانه شیررود بین سنین وجود ندارد. بنابراین احتمالاً دلیل کاهش ویژگی‌های زیستی اسپرم جمعیت ماهی سفید رودخانه قشلاق

سنندج را به پایین بودن سن این مولدین نمی‌توان نسبت داد و به احتمال زیاد شرایط محیطی (آب شیرین) و تغذیه‌ای موجب این کاهش گردیده است. مقایسه نتایج طول و وزن مولدین ۲ و ۳ ساله جمعیت رودخانه قشلاق سنندج (۲۲/۵ سانتی‌متر و ۱۳۳/۴۱ گرم) با دریای خزر (۳۱/۷۱ سانتی‌متر و ۴۵۸/۱۰۵ گرم) (باوند سوادکوهی و همکاران، ۱۳۹۱) نشان می‌دهد که شرایط محیطی موجب کاهش رشد مولدین در رودخانه قشلاق سنندج شده است. همچنین یکی از دلایل دیگر کاهش ویژگی‌های زیستی اسپرم جمعیت رودخانه قشلاق سنندج رشد پایین این مولدین باشد. یون‌های سدیم، پتاسیم و کلراید در برقراری تعادل اسموتیکی منی نقش دارند (Verma et al., 2009). براساس نتایج این پژوهش مانند سایر ماهیان استخوانی یون‌های سدیم، پتاسیم و کلراید یون‌های غالب پلاسمای سمینال بودند. مقادیر این یون‌ها در پلاسمای سمینال ماهی سفید رودخانه قشلاق به نسبت فیل ماهی (Aramli et al., 2013) و تاسماهی ایرانی (Alavi et al., 2004) بالاتر بود. به دلیل اینکه این یون‌ها در برقراری تعادل اسموتیک نقش دارند پس می‌توان بالا بودن فشار اسمزی پلاسمای سمینال کپور ماهیان به نسبت ماهیان خاویاری و آزادماهیان را ناشی از غلظت بالای این یون‌ها دانست. با مطالعه‌ای که توسط فلاح شمسی و همکاران (۱۳۹۰ الف) بر روی مولدین مهاجر به رودخانه سفیدرود صورت گرفت، مشاهده شد که یون‌های سدیم و کلراید پلاسمای سمینال مولدین ماهی سفید مهاجر به رودخانه سفیدرود به ترتیب ۹۶ و ۱۰۳/۷ میلی‌اکی والان بر لیتر می‌باشد که از لحاظ مقایسه‌ای پایین‌تر از یون‌های سدیم و کلراید پلاسمای سمینال مولدین صید شده از رودخانه قشلاق سنندج است. بالا

بودن مقدار سدیم و کلراید در پلاسمای سمینال مولدین نر ماهی سفید دریای خزر در رودخانه قشلاق سنندج می‌تواند ناشی از فعالیت سلول‌های کلراید موجود در تیغه‌های ثانویه آبشش باشد. در غشای سیتوپلاسمی سلول‌های کلراید پمپ‌های $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ وجود دارند. این پمپ‌ها در نقل و انتقال یون‌های سدیم و کلراید نقش دارند (Evans *et al.*, 2005). ماهی سفید قشلاق سنندج تمام مراحل زندگی خود را در آب شیرین سپری می‌کند لذا زمان بیشتری جهت سازگاری سلول‌های کلراید با شرایط محیطی را در اختیار داشته که احتمالاً موجب افزایش غلظت یون‌های سدیم و کلراید در پلاسمای سمینال مولدین گردیده است. در صورتی که در ماهی سفید مهاجر به رودخانه سفیدرود، مولدین مراحل قبل از تخم‌ریزی را در دریا سپری کرده و مهاجرت کوتاهی جهت تخم‌ریزی به رودخانه انجام می‌دهد که مدت زمان ماندن در رودخانه بسیار اندک است و مولد زمان کافی برای سازگار نمودن سلول‌های کلراید خود با شرایط جدید زیستگاه را ندارد. لذا مطابق شیب غلظت یون‌های سدیم و کلراید به بیرون دفع می‌گردد و غلظت این یون‌ها در پلاسمای کاهش می‌یابد. ترکیبات آلی پلاسمای سمینال مولدین ماهی سفید در رودخانه قشلاق سنندج با نتایج گزارش شده برای مولدین ماهی سفید مهاجر به رودخانه سفیدرود توسط فلاح شمسی و همکاران (۱۳۹۰الف) نشان می‌دهد که مقادیر پروتئین، کلسترول و تری‌گلیسرید در پلاسمای سمینال مولدین ماهی سفید مهاجر به رودخانه سفیدرود (به ترتیب ۰/۳ گرم در دسی‌لیتر، ۲۰/۳۵ و ۲۴/۸۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) پایین‌تر از جمعیت ساکن در رودخانه قشلاق سنندج بود. در صورتی که مقادیر گلوکز و اوره در پلاسمای

سمینال مولدین ماهی سفید مهاجر به رودخانه سفیدرود (به ترتیب ۲/۷ و ۱۹/۳۵ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) بالاتر از جمعیت ساکن در رودخانه قشلاق گزارش شد. فلاح شمسی و همکاران (۱۳۹۰الف) نشان دادند که گلوکز با درصد لقاح رابطه عکس دارد اما تری‌گلیسرید، پروتئین کل، کلسترول و اوره با لقاح و درصد هچ رابطه مستقیم دارد. از آنجایی که میزان تری‌گلیسرید، کلسترول و پروتئین کل پلاسمای سمینال مولدین ساکن در رودخانه قشلاق سنندج بالا بود، بصورت ثوری می‌توان گفت که اسپرم ماهی سفید قشلاق سنندج نیز انرژی لازم جهت انجام لقاح را دارا می‌باشد. زیستگاه از طریق منابع غذایی موجود در آن بر ترکیبات آلی پلاسمای سمینال بخصوص ترکیبات لیپیدی اثرگذار است. ترکیبات پلاسمای سمینال و غشای سیتوپلاسمی اسپرم در ارتباط مستقیم با ترکیبات غذایی است (Asturiano *et al.*, 2001). براساس پژوهشی که کریمیان و همکاران در سال ۱۳۸۹ بر روی جوامع زیستی رودخانه قشلاق سنندج انجام دادند، گزارش شد که عمده جامعه زیستی در رودخانه قشلاق سنندج حشرات از گروه یک روزه‌ها هستند اما عمده جامعه زیستی دریای خزر کرم‌های خونی تویفکس و سخت پوست گاماروس است (میرزاجانی و همکاران، ۱۳۸۴). عمده ترکیبات لاشه هر دو گروه حشرات و سخت پوستان پروتئین می‌باشد که بازتابی هم در ترکیبات پلاسمای سمینال مولدین نر ماهی سفید هر دو رودخانه داشته است.

تستوسترون از بیضه ترشح می‌گردد و مقدار آن در زمان بلوغ ماهی به حداکثر میزان خود می‌رسد این هورمون مراحل اسپرم‌سازی از اسپرماتوگونی تا مرحله تولید اسپرماتید فعال را حمایت می‌کند. تستوسترون بر

قابلیت لقاح اسپرم اثرگذار است. هورمون تستوسترون نقش کلیدی در فعال نمودن آنزیم‌های فولیکولی جهت ساختن پروژستین‌ها دارد. از پروژستین‌های مهم در ماهیان دی‌هیدروکسی پروژسترون است که مقدار این هورمون در ماهیان استخوانی اندک و کمتر از ۱ نانوگرم در میلی‌لیتر سرم خون است که این نشان‌دهنده نقش اندک این هورمون در فرآیند اسپرماتوزنیز است. دی‌هیدروکسی پروژسترون از بیضه و اسپرم بالغ ترشح می‌شود (Scott et al., 2010) و با اثرگذاری بر کانال‌های یونی غشای سیتوپلاسمی اسپرم تحرک اسپرم را کنترل می‌کند. Nikoo و همکاران، (۲۰۱۰) گزارش کردند که سطح استروئیدهای جنسی تستوسترون و دی‌هیدروکسی پروژسترون سرم خون در مولدین صید شده از رودخانه سفیدرود در مرحله کاملاً رسیده به ترتیب ۰/۵۴ و ۰/۵۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر بود. در تحقیق حاضر سیال بودن اسپرم و بالا بودن مقادیر این هورمون‌ها در سرم خون نشان می‌دهد که بیضه در مرحله کاملاً رسیده قرار دارد. وجود تراکم بالای سلول‌های اسپرماتوزوآ نیز در تصاویر بافت شناسی بیضه موید این امر می‌باشد. در واقع حضور غالب اسپرماتوزوآ در بیضه نشان دهنده این است که زیستگاه مانعی برای رسیدگی جنسی گناد نبوده و بیضه مراحل تکامل و رسیدگی خود را در دریاچه قشلاق انجام داده است و به آب لبشور جهت رسیدگی گنادی مشابه آنچه در دریای خزر است نیاز ندارد. در مجموع الگوی رشد بیضه ماهی سفید سیستم لوبولار بوده و مطابق با تحقیق صورت گرفته توسط فرزادفر و همکاران (۱۳۹۲)، در تحقیق حاضر نیز در مرحله‌ی بالغ سلول‌های مربوط به تمامی مراحل اسپرماتوزن مشاهده گردید. تحقیقات بیشتری لازم است تا ظرفیت لقاح

اسپرم مولدین ماهی سفید رودخانه قشلاق سنج نیز آزمایش گردد. همچنین با بررسی وضعیت رسیدگی مولدین ماده ماهی سفید دریای خزر ساکن در رودخانه قشلاق سنج نیز می‌توان امکان تکثیر مصنوعی این گونه‌ی با ارزشی نیز در آب‌های داخلی استان کردستان بررسی کرد.

سپاسگزاری

لازم است مراتب قدردانی و سپاس خود را از آقای دکتر محمدی (آزمایشگاه تشخیص طبی وردی سنج) به سبب همکاری در اجرای این تحقیق اعلام داریم. همچنین از دانشگاه کردستان جهت تأمین هزینه‌های مالی این پروژه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. باوند سوادکوهی، ا.، خارا، ح.، یوسفیان، م.، نظامی، ش.، اجرایی، ف.، ۱۳۹۱. تعیین رابطه سن مولدین با عوامل کارآیی تکثیر مصنوعی ماهی سفید دریای خزر در رودخانه شیروود. مجله شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر، ۶(۱)، ۴۳-۵۶.
۲. رضوی صیاد، ب.، ۱۳۷۸. مقدمه‌ای بر اکولوژی دریای خزر. موسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران، ۹۰ صفحه.
۳. شیدایی، ل.، زمینی، ع.، وهاب‌زاده، ح.، برادران نویری، ش.، ۱۳۹۱. بررسی تأثیرات یون‌ها در کیفیت اسپرماتوزوآی تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin, 1989) تحت شوری‌های مختلف. نشریه توسعه آبی‌پروری، ۲(۶)، ۳۷-۴۷.
۴. فرزادفر، ف.، حیدری، ب.، عفوری رحیم آبادی، ز.، ۱۳۹۲. مورفوهیستولوژی گناد نر ماهی سفید دریای

- ratio, ions and osmolality on sperm motility. *Theriogenology*, 68(2), 276–283.
13. Aramli, M.S., Nazari, R.M., Kalbassi, M.R., Aramli, S., 2013. Semen of beluga, *Huso huso*: Ionic content and osmolality of seminal plasma and their physiological correlation with sperm motility indices. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 4, 079.
 14. Asturiano, J.F., Sorbera, L.A., Carrillo, M., Zonus, S., Ramos, J., Navarro, J.C., Bromage, N., 2001. Reproductive performance in male European Seabass (*Dicentrarchus labrax* L) fed two PUFA enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture*, 194(2), 173–190.
 15. Bahrami Kamangar, B., Ghaderi, E., Hoseinpour, H., 2012. The fish biodiversity of Gheshlagh River (Sanandaj, Iran), a tributary of Tigris basin With occurrence of *Rutilus kutum* and *Hemiculter leucisculus*. The GIAN International Symposium on "Biodiversity in Zagros Region", 5-6 May, Tehran, Iran.
 16. Bavand Savadkouhi, E., Khara, H., 2017. Influence of broodstock age on reproductive performance in Kutum, *Rutilus kutum* in the Shiroad River of the southern Caspian Sea (Iran-Mazandaran-Tonekabon). *Caspian Journal of Environmental Science*. 15(3). 205–212.
 17. Billard, R., Breton, B., 1978. Rhythms of reproduction in teleost fish. In Thorpe, J.E. (Ed.), *Rhythmic Activity of Fishes*, Academic Press, New York, 31–53.
 18. Billard, R., Cosson, J., 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Experimental Zoology*, 261(2), 122–131.
 19. Biswas, S.P., 1993. *Manual of methods in fish biology*. South Asian Publishers, New Delhi, 157 P.
 20. Blazer, V.S., 2002. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(1), 85–101.
 21. Butts, I.A.E., Love, O.P., Farwell, M., Pitcher, T.E., 2012. Primary and secondary sexual characters in alternative reproductive tactics of Chinook salmon: Associations with androgens and the maturation-inducing steroid. *General and Comparative Endocrinology*, 175(3), 449–456.
 22. Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Review*, 85(1), 97–177.
- خزر (*Rutilus frisii kutum*). *مجله اقیانوس شناسی*، ۱۲(۲)، ۱۵–۲۲.
۵. فلاح شمسی، ز.، نظامی، ش.، خارا، ح.، برادران نویری، ش.، علیپور، ع.، علیجانپور، ن.، امیری، ک.، ۱۳۹۰ (الف). اثر ترکیبات یونی بر کارایی تکثیر مصنوعی ماهی سفید مهاجر به رودخانه سفیدرود. *مجله آبریزان و شیلات*، ۲(۵)، ۳۱–۳۵.
 ۶. فلاح شمسی، ز.، نظامی، ش.، خارا، ح.، برادران نویری، ش.، باقی‌زاده، ا.، علی‌نای رودسری، م.، ۱۳۹۰ (ب). بررسی تاثیر برخی ترکیبات بیوشیمیایی اسپرم بر کارایی تکثیر مصنوعی ماهی سفید مهاجر به رودخانه سفیدرود. *مجله علمی پژوهشی زیست‌شناسی دریا*، ۳(۱۱)، ۵۹–۶۴.
 ۷. کریمیان، ع.، جوانشیر، آ.، قربانی، ر.، ۱۳۸۹. تعیین ویژگی‌های زیستی کیفیت آب رودخانه قشلاق سندر، ایران. *مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی*، ۲(۱۶)، ۵۵–۶۳.
 ۸. میرزاجانی، ع.، غنی‌نژاد، د.، قانع‌ساسان‌سرائی، ا.، ۱۳۸۴. ارتباط میزان صید پره ساحلی با فراوانی بی‌مهره‌گان کفزی دریای خزر در حوضه استان گیلان. *پژوهش و سازندگی در امور دام و آبریزان*، ۱۸(۳)، ۹–۱.
 ۹. ولی‌پور، ع.، خانی‌پور، ع.ا.، ۱۳۹۴. زی‌فن تکثیر مصنوعی ماهی سفید (*Rutilus frisii*) فرم پائیزه دریای خزر. *نشریه توسعه آبریز‌پروری*، ۹(۴)، ۷۵–۸۸.
 10. Aas, G.H., Refstie, T., Gjerde, B., 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 95(1), 25–32.
 11. Alavi, S.M.H., Cosson, J., Karami, M., Abdolhay, H., Amiri, B.M., 2004. Chemical composition and osmolality of seminal fluid of *Acipenser persicus*; their physiological relationship with sperm motility. *Aquaculture Research*, 35(13), 1238–1243.
 12. Alavi, S.M.H., Rodina, M., Policar, T., Kozak, P., Psenicka, M., Linhart, O., 2007. Semen of *Perca fluviatilis* L: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution

- fish and evaluation of sperm quality. *Aquaculture*, 463, 1-24.
28. Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234(4), 1-28.
29. Scott, A.P., Sumpter, J.P., Stacey, N. 2010. The role of the maturation-inducing steroid, 17,20beta-dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. *Journal of Fish Biology*, 76(1), 183-224.
30. Tekin, N., Secer, S., Akcay, E., Bozkurt, Y., 2003. Cryopreservation of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bamidgeh*, 55, 208-212.
31. Verma, D.K., Routray, P., Dash, C., Dasgupta., Jena, J.K., 2009. Physical and biochemical characteristics of semen and ultrastructure of spermatozoa in six carp species. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9, 67-76.
32. Zadmajid, V., 2016. Comparative effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and Ovaprim™ (sGnRHa + domperidone) on the reproductive characteristics of wild-caught male Longspine scraper, *Capoeta trutta* (Heckel, 1843). *Aquaculture*, 463(1), 7-15.
23. Fallah Shamsi, S.Z., Khara, H., 2015. Influence of broodstock age on sperm quality traits in *Rutilus frisii* and its effect on fertilization success. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(4), 985-996.
24. Golpour, A., Esfandiyari, M., Dadras, H., 2015. The influence of ovarian fluid on the sperm physiology of *Rutilus kutum*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(4), 818-825.
25. Khara, H., Alijanpour, N., Fallah Shamsi, S.Z., Sattari, M., Amiri, K., Rahbar, M., Ahmadnezhad, M., 2012. Effects of water temperature and migration time on some fecundity indices and fertilization rate of female Kutum, *Rutilus frisii kutum*, migratory to Shiroud River in the southwest Caspian Sea. *Caspian Journal of Environment Science*, 10(1), 9-14.
26. Nikoo, M., Faghani Langroudi, H., Esmaili Molla, A., 2010. Serum steroid hormones in Kutum *Rutilus frisii kutum* during spawning season. *International Aquatic Research*, 2, 131-133.
27. Mylonas, C.C., Duncan, N.J., Asturiano, J.F., 2016. Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured