University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 8, No. 2, 2022, pages: 43-51
DOI: 10.22124/janb.2023.24081.1191

Study on feasibility of sperm injection in ovarian for induced propagation of Koi carp (*Cyprinus carpio* var. Koi)

Ali Hajibeglou*, Mohammd Sudagar, Mohammad Mazandarani, Masoumeh Machanlou
Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran

Received 1 July 2022 Revised 11 September 2022 Accepted 14 September 2022

KEYWORDS

Fertilization
Ovary
Injection
Sperm
Koi carp

ABSTRACT

One of the limitations in fish reproduction is the duration of sperm motility. One of the hypotheses related is the possibility that sperm survive relatively long in the female body. Therefore, in this study, the reproductive ability of koi carp (*Cyprinus carpio* var. Koi fish) was investigated by direct injection of sperm into the female ovaries. Three experimental groups were investigated in this study. In the control group, fertilization was performed by the conventional method. In the second group, sperm was injected directly into the ovaries 12 hours before ovulation, and in the third group, sperm were injected 2 hours before ovulation. In each group, 2 males and 3 females were used. Fertilization was performed by the dry fertilization method, using a mixture of cow's milk and water in a 1:10 ratio to eliminate adhesion. The results showed that in groups 2 and 3, which were injected directly into the ovary 2 and 12 hours before ovulation, respectively, the percentage of fertilization did not show a significant difference ($p<0.05$), but the percentage of fertilization in the control group was significantly ($p<0.05$) higher than groups 2 and 3. The percentage of hatching and survival showed no significant difference between control group and groups 2 and 3 ($p<0.05$). The results showed that ovarian fluid in carp could not activate sperm for motility. In general, it can be said koi carp sperm can maintain their fertilization ability in the ovaries of female for at least 12 hours.

*Corresponding author: alihajibeglou@gmail.com

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال هشتم، شماره دوم، تابستان ۱۴۰۱، صفحات ۵۱-۴۳

DOI: 10.22124/janb.2023.24081.1191

"مقاله پژوهشی"

مطالعه امکان تزریق اسپرم به درون تخمدان به منظور القاء تکثیر در ماهی کوی (*Cyprinus carpio* var. Koi)

علی حاجی بگلو*، محمد سوداگر، محمد مازندرانی، معصومه ماچانلو

گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، گلستان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۰ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۶/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۳

چکیده

از جمله محدودیت‌ها در تکثیر ماهیان طول مدت زمان تحرک اسپرم است. یکی از فرضیات در این زمینه امکان زنده ماندن اسپرم به مدت نسبتا طولانی‌تر در بدن جنس ماده است. از این جهت در این تحقیق امکان تکثیر ماهی کوی از طریق تزریق مستقیم اسپرم به داخل تخمدان ماهی ماده مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق، سه گروه آزمایشی شامل گروه شاهد که لقاح مطابق روش مرسوم انجام شد، گروه دوم ۱۲ ساعت قبل از تخم‌کشی و در گروه سوم ۲ ساعت قبل از تخم‌کشی تزریق مستقیم اسپرم به داخل تخمدان انجام شد. در هر یک از گروه‌ها ۲ ماهی نر و ۳ ماهی ماده استفاده شد. لقاح به روش لقاح خشک انجام شد و برای از بین رفتن چسبندگی از مخلوط شیر گاو و آب (۱:۱۰) استفاده شد. نتایج نشان داد در گروه‌های ۲ و ۳ که به‌ترتیب ۲ و ۱۲ ساعت قبل از تخم‌کشی تزریق مستقیم اسپرم به داخل تخمدان صورت گرفته بود، درصد لقاح اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($p>0/05$) اما درصد لقاح در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری ($p<0/05$) بیشتر از گروه ۲ و ۳ گزارش شد. همچنین، درصد تفریخ و درصد بازماندگی اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و گروه‌های ۲ و ۳ نشان ندادند ($p>0/05$). نتایج نشان داد که مایع تخمدانی در ماهی کوی نمی‌تواند سبب فعال کردن اسپرم برای تحرک شود. در مجموع می‌توان بیان داشت که اسپرم ماهی کوی می‌تواند حداقل به مدت ۱۲ ساعت قابلیت لقاح خود را در داخل تخمدان ماهی ماده حفظ کند.

کلمات کلیدی

لقاح

تخمدان

تزریق

اسپرم

ماهی کوی

نویسنده مسئول: alihajibeglou@gmail.com

مقدمه

در بسیاری از ماهیان پرورشی، از دستکاری‌های هورمونی به عنوان تنها ابزار مدیریتی برای افزایش رهاسازی تخمک و اسپرم انجام می‌شود. همچنین، ممکن است از هورمون درمانی نیز برای تحریک گامتوژنز و القاء مراحل رسیدگی در گامت‌ها استفاده شود تا بتوان از آنها برای دورگه-گیری‌های بین گونه‌ای، دستکاری‌های کروموزومی یا لقاح مصنوعی در برنامه‌های اصلاح نژاد استفاده کرد (Müller et al. 2018a).

چندین مطالعه در رابطه با القای مصنوعی تخمک‌گذاری با استفاده از انواع مختلف عوامل هورمونی در پرورش آبزیان مانند گنادوتروپین جفتی انسان (Ortega-Salas et al. 2010)، عصاره هیپوفیز (Sampaio and Sato, 2006; Ittzés et al. 2015) و آنالوگ GnRH (Ittzés et al. 2015) صورت گرفته است. با این حال، همه گونه‌های پرورشی به روش قابل پیش‌بینی تخمک-گذاری نمی‌کنند. بنابراین استفاده به منظور تخمریزی/تخمریزی در اسارت/ روش تخمریزی شبیه طبیعی برای اکثر گونه‌ها ترجیح داده می‌شود (Okamura et al. 2014).

مسئله این است که استفاده به منظور تخم‌ریزی (به عنوان مثال اردک ماهی) می‌تواند تنوع را در ژنوم طی پرورش طولانی مدت کاهش دهد زیرا برخی والدین به طور نامتناسبی به نسل بعدی کمک می‌کنند. این کاهش تنوع در ذخایر ژن موجود می‌تواند در پرورش کپور چینی، کپور علف‌خوار (*Ctenopharyngodon idella*)، کپور سرگنده (*Hypophthalmichthys nobilis*)، کپورمعمولی (*Cipinus carpio*) و کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) در آسیا باشد. در این موارد، بچه ماهی پس از تزریق هورمونی به استخر یا مخزن بازگردانده می‌شود و به طور طبیعی تخمریزی می-کند. نسبت جنسی این روش تخمریزی به طور کلی یک ماده با دو نر است و باز هم برخی والدین مقدار زیادی ماهی جوان تولید می‌کنند. بنابراین، بهتر است روشی باشد که بتواند تخمریزی را با لقاح آزمایشگاهی ترکیب کند (Müller et al. 2018a).

در این روش، عامل هورمونی از طریق مجاری تخمدان به داخل حفره تخمدان با استفاده از کاتتر تزریق شد (Németh et al. 2012). از کاتترها (لوله نازک) در پرورش آبزیان برای دستکاری‌های مختلف داخلی مانند جمع‌آوری اسپرم و بیوپسی تخمدان استفاده می‌شود. در نسبت‌های کوچک، هورمون‌ها نیز معمولا از طریق کاتتر به به طور مستقیم به تخمدان تزریق می‌شوند که ایمپلنت داخلی یا لاواژ تخمدان نیز نامیده می‌شود. از کاتترها می-توان برای اهداف دیگر نیز استفاده کرد (Müller et al. 2020). به طور مثال Müller و همکاران (۲۰۱۸a) رویکرد جدیدی را برای رساندن اسپرم به تخمک کپور معمولی استفاده کردند و نتایج آزمایش تزریق اسپرم به درون حفره تخمدان ماهی کپور معمولی نشان داد همه نمونه‌های اسپرم‌های تزریق شده به تخمدان منجر به لقاح تعدادی از تخمک‌ها شدند و جنین حاصله از آنها به‌طور طبیعی تکامل یافتند. این نتیجه نشان می‌دهد که اسپرماتوزاها بدون از دست دادن فعالیت بیولوژیک تا ۱۲ ساعت در تخمدان و مجرا ذخیره می‌شوند و تخمک‌های اوواله شده می‌توانند پس از آزاد شدن از حفره بدن بارور شوند. در این بررسی، درصد لقاح به‌دست آمده در محدوده وسیعی متغیر بود (۸۱/۲-۲۴/۲ درصد). شواهد این آزمایش برای نخستین بار نمایانگر پتانسیل این روش برای استفاده متداول و همیشگی از آن به‌عنوان جایگزین لقاح مصنوعی و آزمایشگاهی برای تکثیر ماهیان بود.

در این آزمایش فرض بر آن است که مشابه گونه‌های ماهیان با لقاح داخلی، چنانچه اسپرماتوزوآیی که تازه به اسپرم تبدیل شده است، مستقیما از طریق مجرای تخم‌بر به داخل تخمدان تزریق شود، غیرفعال باقی مانده و قابلیت لقاح خود را برای یک بازه زمانی نسبتا طولانی حفظ خواهد کرد. طبق این فرضیه انتظار می‌رود پس از اوولاسیون و رهاسازی تخمک‌ها همراه با اسپرماتوزوآهای تزریق شده بر سطح‌شان به درون آب، لقاح رخ دهد. بنابراین چنانچه انتقال و توزیع اسپرم به درون تخمدان ماهی کوی بتواند منجر به دستیابی به نوزادان طبیعی شود، می‌توان این روش را به‌عنوان جایگزینی برای دیگر روش‌های القای تکثیر در ماهیان مورد استفاده قرار داد.

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط آزمایش

برای این آزمایش تعداد ۶ قطعه ماهی مولد نر (با میانگین سن ۳-۲ سال) و ۹ قطعه ماهی مولد ماده (با میانگین سن ۴-۳ سال) ماهی کوی از کارگاه تکثیر و پرورش ماهی کوی

(بهشهر، مازندران) تهیه شد. نگهداری مولدین نر و ماده به‌طور جداگانه در مخازن ۱۰۰۰ لیتری انجام شد. در طول دوره آزمایش، دوره نوری به صورت ۱۰ ساعت روشنایی و ۱۴ ساعت تاریکی رعایت شد. در این آزمایش، قبل از تخم-کشی و اسپرم‌گیری مولدین با گل میخک به مقدار محلول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آب، بیهوش شدند (Coyle et al. 2004).

القاء هورمونی

القاء هورمونی اوولاسیون از طریق تزریق غده هیپوفیز هموژن شده کپور طبق روش Horváth و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد. برای این منظور، هیپوفیز کپور هموژن شده در کلریدسدیم ۰/۹ درصد به‌صورت درون صفاقی و در پایه باله شکمی تزریق گردید. تزریق اولیه ۱ میلی‌لیتر هیپوفیز کپور (۰/۳ میلی‌گرم هیپوفیز به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و تزریق نهایی با ۱/۵ میلی‌لیتر هیپوفیز کپور هموژن شده (۲/۷ میلی‌گرم هیپوفیز به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) انجام شد. مولدین نر ۱۲ ساعت قبل از تیمار هورمونی مولدین ماده، تنها یک مرتبه با ۱ میلی‌لیتر هیپوفیز کپور هموژن شده (۳ میلی‌گرم هیپوفیز به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) تزریق شد.

جمع‌آوری اسپرم

برای فعال نمودن تحرک اسپرم‌ها به منظور اندازه‌گیری درصد اسپرم‌های متحرک از محلول فعال‌کننده (۱۰ میلی-مول تریس، ۲۰ میلی‌مول نمک، ۲ میلی‌مول کلسیم کلرید، pH=۸/۵) با نسبت رقیق‌سازی ۱ به ۲۰۰۰ در دمای اتاق (۲۲ °C) استفاده شد. حرکت اسپرم با تاخیر زمانی کمتر از ۷ ثانیه بعد از شروع فعالیت، با میکروسکوپ فازکنتراست و با عدسی چشمی ۴۰ ثبت گردید. اندازه‌گیری میزان حرکت برای هر تیمار و در هر زمان، در سه تکرار انجام شد. درصد اسپرم‌های متحرک پس از ثبت توسط دوربین، با فاصله زمانی ۲۰ صدم ثانیه توسط نرم افزار آدوب‌پرایمر (Adobe Premiere) عکس‌برداری شد و درصد اسپرم-های متحرک اندازه‌گیری شد (Turner and Montgomerie, 2002; Goli et al. 2015). تنها نمونه‌های اسپرم با حداقل ۸۰ درصد تحرک در آزمایش استفاده شد.

تزریق اسپرم

در این آزمایش سه گروه آزمایشی شامل گروه اول که گروه شاهد بود و مطابق روش مرسوم لقاح انجام شد. در گروه دوم تزریق اسپرم ۱۲ ساعت قبل از تخم‌کشی و در گروه سوم تزریق اسپرم ۲ ساعت قبل از تخم‌کشی انجام شد. در گروه ۱ (شاهد) مراحل القای اوولاسیون بر اساس روش Horváth و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد (۲ قطعه ماهی نر و ۳ قطعه ماهی ماده). ماهیان این گروه مطابق روش مرسوم، از ماهیان ماده تخم‌کشی شد و در کاسه پلاستیکی ریخته شده و سپس اسپرم ماهی نر به آن اضافه شد. این گروه، گروه شاهد آزمایش بود. در گروه ۲، نمونه‌های اسپرم استحصال شده ۱۲ ساعت قبل از تخم‌کشی به درون حفره تخمدان تزریق شد (۲ قطعه ماهی نر و ۳ قطعه ماهی ماده). در گروه ۳، نمونه‌های اسپرم استحصال شده ۲ ساعت قبل از تخم‌کشی به درون حفره تخمدان تزریق شد (۲ قطعه ماهی نر و ۳ قطعه ماهی ماده).

نمونه‌های اسپرم (اسپرماتوزوآ همراه با مایع سمینال) از طریق پاپیلای تناسلی به درون حفره تخمدان مولدین ماده تزریق شد. تزریق با استفاده از یک شلنگ یا لوله باریک و منعطف سیلیکونی (با قطر بیرونی ۱/۴ میلی‌متر و قطر داخلی حدود ۱ میلی‌متر) متصل شده به یک سرنگ (۵ میلی‌لیتر) انجام شد و مستقیما از طریق مخرج و مجرای اوویداکت به درون تخمدان فرو برده شد. به منظور جلوگیری از اتلاف گامت‌ها، ناحیه تناسلی ماهیان ماده بخیه زده شد. در ماهیان گروه‌های ۲ و ۳ تزریق اسپرم به میزان ۱ میلی‌لیتر اسپرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماده انجام شد. در گروه شاهد نیز میزان اسپرم، ۱ میلی‌لیتر به ازای وزن بدن ماده در نظر گرفته شد.

لقاح

لقاح به روش لقاح خشک انجام شد (Basavaraju et al. 2002). تخم‌های گروه شاهد با اسپرم تازه استحصال شده ترکیب شدند. برای این منظور، پس از آنکه تخم و اسپرم در ظرف مخصوص لقاح به‌آرامی و کامل با یکدیگر مخلوط شدند، برای فعال‌سازی اسپرم و نفوذ به درون تخمک مقداری آب اضافه شد. ۲ تا ۴ دقیقه بعد برای از بین رفتن چسبندگی از مخلوط شیر گاو و آب به نسبت ۱: ۱۰ استفاده شد (Recoubratsky et al. 1992). در تیمارهای آزمایشی ۲ و ۳ نیز گامت‌های تازه استحصال

شده از جنس ماده با استفاده از همین روش فعال شده و لقاح یافتند. تخم‌ها به آرامی و با استفاده از یک پر، هم زده شدند و محلول لقاح (شیر و آب به نسبت ۱ : ۱۰) تقریبا هر ۲۰-۱۵ دقیقه تعویض شد. یک ساعت و نیم بعد نمونه-های تخم از هر گروه جمع‌آوری شده و درون پتری‌دیش در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند. در هر پتری دیش حدود ۱۰۰ قطعه تخم قرار داده شد. همچنین برای هر گروه ۱۰ تکرار در نظر گرفته شد.

بررسی کیفیت لقاح و تخم

کیفیت لقاح و تخم‌ها از طریق محاسبه درصد لقاح، درصد تفریخ و درصد بقای جنین‌ها درانجام شد. برای اندازه‌گیری درصد لقاح، ۶ ساعت پس از انجام عمل لقاح تخم‌های لقاح نیافته (به رنگ سفید و مات) جدا گردیده و شمارش شدند. سپس درصد لقاح برای این گروه‌ها محاسبه و میانگین این گروه‌ها به عنوان درصد لقاح قرار داده شد. درصد لقاح بر طبق فرمول Muir و Robert (۱۹۸۵) محاسبه شد:

۱۰۰ × تعداد کل تخم‌ها / تعداد تخم‌های لقاح یافته = درصد لقاح

بعد از مدت زمان ۴۸ ساعت از زمان لقاح، برای محاسبه درصد تفریخ از فرمول زیر استفاده گردید (Pradeep et al. 2012):

۱۰۰ × تعداد کل تخم‌های لقاح یافته / تعداد لاروهای تفریخ شده = درصد تفریخ

بعد از جذب کیسه زرده تغذیه خارجی لاروها آغاز گردید. ابتدا برای تغذیه اولیه از مخلوط شیرخشک و زرده تخم-مرغ پخته و سپس از ناپلی آرتمیا، پودر جلبک اسپیرولینا و کرم خونی استفاده گردید. ۱۰ پس از شروع دوره پرورش میزان بقای لاروها در هر تیمار محاسبه گردید. در طی این ۱۰ روز لاروها در مخازن ۵ لیتری با تعویض آب روزانه یک سوم نگهداری شدند. برای محاسبه درصد بقا از فرمول زیر استفاده گردید (Pradeep et al. 2012):

۱۰۰ × تعداد لاروهای تفریخ شده / تعداد لاروهای زنده مانده = درصد بقای لارو

پارامترهای کیفی آب

میانگین دما، اکسیژن محلول و pH با استفاده از دستگاه دیجیتالی (Horiba U10, Japan) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری سختی کل از کیت آزمایشگاهی (پارس آزمون) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

نمونه‌برداری در قالب طرح کاملاً تصادفی بود و همچنین هر تیمار ۱۰ تکرار داشت. داده‌های به‌دست آمده به کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن استفاده شد.

نتایج

نتایج مربوط به درصد لقاح در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان داد در گروه‌های ۲ و ۳ که به ترتیب ۲ و ۱۲ ساعت قبل از تخم‌کشی تزریق اسپرم به داخل تخمدان صورت گرفته بود، درصد لقاح اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($p>۰/۰۵$) اما درصد لقاح در گروه شاهد به‌طور معنی داری ($p<۰/۰۵$) بیشتر از گروه ۲ و ۳ گزارش شد. همچنین نتایج مربوط به درصد تفریخ نشان داد که اختلاف معنی داری بین گروه شاهد و گروه های ۲ و ۳ وجود نداشت. به‌طور مشابه، درصد بازماندگی لارو پس از ۱۰ روز نیز نشان داد که بین گروه ۲ و ۳ که تحت تیمار تزریق اسپرم قرار گرفتند با گوره شاهد اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($p>۰/۰۵$). در این آزمایش اسپرم‌های مورد استفاده همگی درصد تحرک بالاتر از ۸۰ درصد داشتند و اختلاف معنی-داری بین گروه‌های مختلف دیده نشد (جدول ۱).

نتایج مربوط به فاکتورهای کیفی آب نیز نشان داد که با شرایط تکثیر کپورماهیان مغایرت ندارد (جدول ۲).

جدول ۱ میانگین درصد لقاح، تفریخ و بازماندگی در ماهیان کوی تحت تیمار تزریق اسپرم.

	گروه ۱ (شاهد)	گروه ۲ (تزریق ۱۲ ساعت قبل از تخم‌کشی)	گروه ۳ (تزریق ۲ ساعت قبل از تخم‌کشی)
وزن مولد نر (گرم)	۱۳۵۰	۱۴۰۰	۱۲۵۰
وزن مولد ماده (گرم)	۱۵۶۰	۱۳۵۰	۱۴۵۰
تعداد مولد نر	۲	۲	۲
تعداد مولد ماده	۳	۳	۳
درصد لقاح	۷۱/۲۸ ± ۶/۱۵[a]	۳۸/۲۶ ± ۳/۱۸[b]	۴۰/۰۸ ± ۵/۶[b]
درصد تفریخ	۵۷/۱۴ ± ۳/۶[a]	۵۸/۲۳ ± ۷/۴۱[a]	۵۵/۸۶۸ ± ۳/۲۵[a]
درصد بازماندگی لارو	۳۲/۷۸ ± ۲/۱۲[a]	۳۵/۰۲ ± ۱/۰۳[a]	۳۳/۱۲ ± ۲/۶[a]
درصد تحرک اسپرم	۸۹/۴۱ ± ۳/۷۷[a]	۹۱/۲۵ ± ۳/۲۰[a]	۸۸/۵۴ ± ۲/۴۵[a]

در هر ردیف میانگین‌هایی (میانگین ± انحراف معیار) که دارای حروف متفاوت هستند اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$) با یکدیگر دارند.

جدول ۲ پارامترهای کیفی آب.

فاکتور کیفی آب	مقدار
اکسیژن محلول (mg/L)	۷/۹۱ ± ۰/۲۵
pH	۷/۱۲ ± ۰/۰۲
سختی (mg/L بر حسب کربنات کلسیم)	۱۲۱/۵ ± ۶
دما (^oC)	۲۰ ± ۰/۴

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که اسپرم ماهی کوی می‌تواند به مدت ۱۲ ساعت در داخل تخمدان، در داخل بدن ماهی ماده و در داخل مجرای اویداکت زنده بماند و در عین حال از نظر فیزیولوژیک قابلیت لقاح و باروری خود را حفظ کند. زنده ماندن اسپرم به مدت نسبتا طولانی در بدن جنس ماده در ماهیانی که تخم زنده‌گذار یا زنده زا هستند امری کاملا طبیعی می‌باشد (Billard and Cosson, 2020). برای مثال خانواده های ماهیان پوسیلیده از این دست ماهیان هستند. در این خانواده (به‌عنوان مثال ماهی دم‌شمشیری یا پلاتی) جنس نر بالغ دارای اندامی به نام گونوپودیوم است که وسیله‌ای برای انتقال اسپرم به جنس ماده می‌باشد. در واقع باله مخرجی جنس نر تحت تأثیر هورمون‌های جنسی تغییر شکل یافته و ساختاری به نام گونوپودیوم ایجاد می‌کند (Li et al. 2019). تنها یک بار جفت‌گیری کافی است تا جنس ماده بتواند ۴ تا ۵ بار زایمان با فاصله (۲۸ روز) را انجام دهد. گزارش شده است که پس از ورود اسپرم به مجرای تخمک‌بر جنس ماده، اسپرم در داخل لایه‌های ویژه‌ای از مجرای تخمک‌بر جنس ماده ذخیره شده و قادر است تا هفت ماه در این محل زنده مانده و قابلیت لقاح خود را حفظ کند (Shahjahan et al. 2013) و هر زمان که نیاز به اسپرم باشد از این اسپرم استفاده نماید.

در این آزمایش نیز از این روش تولیدمثلی که اسپرم جنس نر وارد بدن جنس ماده می‌شود الگوبرداری شد و به عنوان یک روش لقاح در ماهی کوی استفاده شد. نتایج نشان داد که هم تخمک‌ها و هم اسپرم در داخل تخمدان جنس ماده غیرفعال باقی ماندند و تنها زمانی که گامت‌ها از بدن جنس ماده خارج شد و در تماس با آب قرار گرفتند، شروع به فعالیت نموده و لقاح انجام شد. تحقیقات نشان می‌دهد که تحرک اسپرم در خانواده کپورماهیان آب‌شیرین به دلیل بالا بودن اسمولالیته پلاسمای منی غیرفعال باقی مانده و تنها با کاهش اسمولالیته در زمان تخم‌ریزی فعالیت و تحرک اسپرم آغاز می‌شود (Coyle et al. 2004). همچنین، اسپرم برای رسیدن به میکروپیل تخم، زمان اندکی فعال بوده و نیاز به حرکت در محیط آبی دارد بنابراین الزاما در این تحقیق بعد از خروج گامت‌ها از بدن مولدین ماده به-

منظور انجام لقاح، بلافاصله تخم‌ها در تماس با آب قرار گرفتند (Alavi and Cosson, 2006).

مایع تخمدانی نقش بسیار اساسی در تولیدمثل ایفا می‌کند. مایع تخمدانی توسط لایه اپیتلیوم تخمدان تولید می‌شود و در زنده ماندن و حفظ ویژگی‌های فیزیولوژیک گامت ماده نقش اساسی دارد. مایع تخمدانی از فوق رسیدگی تخم‌ها جلوگیری کرده و همچنین در خارج از بدن جنس ماده نیز تا حد قابل توجهی از تخم در برابر شراط محیطی خارج از بدن ماهی ماده محافظت می‌کند (Müller et al. 2020). Horváth و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که مایع تخمدانی در کپور معمولی نمی‌تواند سبب تحرک اسپرم یا فعال کردن اسپرم برای تحرک شود. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد تزریق اسپرم به داخل تخمدان سبب تحرک و آغاز فعالیت اسپرم نشد و تنها زمانی اسپرم فعالیت خود را آغاز نمود که در خارج از بدن ماهی ماده در تماس با آب قرار گرفت. در این تحقیق درصد لقاح تخم در گروه‌هایی که تحت تیمار تزریق اسپرم قرار گرفتند کمتر از گروه شاهد بود. به نظر می‌رسد یکی از دلایل این امر این باشد که چون تزریق اسپرم تنها به یک طرف تخمدان یا بخشی از تخمدان انجام شد. بنابراین اختلاط کامل اسپرم و تخم در داخل تخمدان به خوبی انجام نشده باشد. همچنین ممکن است اسپرم‌ها در بخشی از تخمدان به لایه‌های داخلی چسبیده باقی مانده و از بدن ماهی ماده خارج نشده باشند. این امکان نیز وجود دارد که اسپرم‌ها در بخشی از توده تخم‌ها به لایه کوریون تخم چسبیده باقی مانده و نتوانسته‌اند خود را به میکروپیل برسانند. همچنین ممکن است که اسپرم‌ها خیلی عمیق یا در ابتدای تخمدان تزریق شده باشند و از این رو زودتر یا دیرتر از تخم‌ها از بدن ماهی ماده خارج شده باشند و در نتیجه روی درصد لقاح اثر منفی گذاشته باشد، اما در هر صورت این آزمایش نشان داد که امکان زنده ماندن اسپرم در داخل تخمدان ماهی کوی وجود دارد. مشابه نتایج این تحقیق، Müller و همکاران (۲۰۱۸a) نیز گزارش کردند که امکان تکثیر ماهی کپور به روش تزریق اسپرم به داخل تخمدان موفقیت‌آمیز می‌باشد اما نتایج تحقیق حاضر از نظر درصد لقاح کمتر از نتایج آنها بود. همچنین، Müller و همکاران (۲۰۱۸b) اسپرم را به همراه عصاره هیپوفیز کپور به عنوان سوسپانسیون به گربه ماهی آفریقایی (*Clarias garepinius*) تزریق کرد. هورمون و اسپرم تزریق شده بعد از استحصال گامت تخمک‌های اوله شده را بارور کرد.

در این آزمایش، اسپرم تنها در یک طرف لوب تخمدان به تخمدان تزریق شد. این امکان‌پذیر است که در طول انکوباسیون، اسپرم‌ها به لایه کوریون تخمک متصل شوند و ممکن است پس از جداسازی، نتوانند با تخم‌هایی که از طرف دیگر منشاء می‌گیرند مخلوط شوند و به طور موثر تماس بگیرند. مایع منی ممکن است تا حدودی در طی انکوباسیون تخمدان جذب شود (Watson et al. 2009; Németh et al. 2012). به نظر می‌رسد اگر در تحقیقات بعدی تزریق اسپرم در چند نقطه از تخمدان انجام شود و یا تزریق در هر دو سمت تخمدان صورت گیرد و همچنین اسپرم بیشتری به ماهی تزریق شود نتایج بهتری به دست آید. استفاده از این روش و بهبود این تکنیک می‌تواند به‌طور بالقوه در تکثیر کنترل شده ماهیان، اصلاح نژاد ماهیان و دستکاری کمتر ماهیان مورد استفاده قرار گیرد.

یکی از مشکلاتی که در مزارع تکثیر ماهیان گرمابی از قبیل کپور وجود دارد این است که ماهی ماده در داخل مخزن آب تخمریزی کرده و در غیاب اسپرم یا جنس ماده این تخم‌ها اتلاف می‌شود. بنابراین، شاید مهم‌ترین کاربرد این روش و بهینه‌سازی آن این باشد که از اتلاف تخم به‌ویژه در زمانی که ماهی ماده در غیاب جنس نر یا اسپرم تخمریزی می‌کند جلوگیری کند.

در مجموع، با توجه به وجود برخی مشکلات در زمینه تکثیر ماهیان، تحقیق در زمینه دستیابی به روش‌های نوین جهت بهبود تکثیر ماهیان امری ضروری می‌باشد و استفاده از الگوی تولیدمثلی ماهیان زنده زا یا تخم‌زنده‌زا که می‌توانند اسپرم را به مدت نسبتا طولانی در داخل بدن نگهداری کنند می‌تواند به‌عنوان یک گزینه مناسب جهت استفاده در سایر ماهیان در نظر گرفت.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را در این پژوهش شناسایی نکردند.

منابع

Alavi, S.M.H., Cosson, J. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and

osmolality: a review. Cell Biology International 30: 1-14.

Basavaraju, Y., Mair, G.C., Kumar, H.M.M., Kumar, S.P., Keshavappa, G.Y., Penman, D.J. 2002. An evaluation of triploidy as a potential solution to the problem of precocious sexual maturation in common carp, *Cyprinus carpio*, in Karnataka, India. Aquaculture 204: 407-418.

Billard, R., Cosson, M.P. 2020. The energetics of fish sperm motility In Controls of Sperm Motility, CRC Press, 153-173.

Coyle, S.D., Durborow, R.M., Tidwell, J.H. 2004. Anesthetics in aquaculture (No. 3900). Southern Regional Aquaculture Center, Stoneville.

Goli, S., Imanpoor, M., Noori, G. 2015. A study on effect of Chromium on sperm motility of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*). Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology) 28: 97-104.

Ittzes, I., Szabo, T., Kronbauer, E.C., Urbányi, B. 2015. Ovulation induction in jundia (*Rhamdia quelen*, Heptapteridae) using carp pituitary extract or salmon GnRH analogue combined with dopamine receptor antagonists. Aquaculture Research 46: 2924-2928.

Li, X., Wang, J., Yu, M., Zhang, X., Wang, W., Tian, H., Ru, S. 2019. 2, 2′-Dithiobis-pyridine induced reproductive toxicity in male guppy (*Poecilia reticulata*). Ecotoxicology and Environmental Safety 169: 778-785.

Müller, T., Horváth, L., Szabó, T., Ittzés, I., Bognár, A., Faidt, P., Kucska, B. 2018a. Novel method for induced propagation of fish: sperm injection in oviducts and ovary/ovarian lavage with sperm. Aquaculture 482: 124-129.

Müller, T., Kucska, B., László, H., Ittzés, Á., Urbányi, B., Blake, C., Guti, C., Csorbai, B., Kovács, B., Szabó, T. 2018b. Successful, induced propagation of African catfish (*Clarias gariepinus*) by ovarian lavage with sperm and hormone mixture. Aquaculture 485: 197-200.

Müller, T., Ács, É., Beliczky, G., Makk, J., Földi, A., Kucska, B., Horváth, L., Ittzés, Á., Hegyi, Á., Szabó, T., Urbányi, B. 2020. New observations about the fertilisation capacity and latency time of sperm inseminated into the ovary of African catfish (*Clarias gariepinus*), an oviparous modelfish. Aquaculture 522: 735109.

Németh, Á., Orbán, K., Faidt, P., Horváth, Á., Muller, T., Szathmári, L., Horváth, L. 2012. Short Communication Induction of ovulation in the Pikeperch (*Sander lucioperca* L.) by ovarian lavage. Journa of Applied Ichthyology 28: 914-915.

Okamura, A., Horie, N., Mikawa, N., Yamada, Y., Tsukamoto, K. 2014. Recent advances in artificial production of glass eels for conservation of anguillid eel populations. Ecology of Freshwater Fish 23: 95-110.

Ortega-Salas, A. L., Rodríguez-Vargas, C. J., López-Macías, J. N. 2010. Evaluación comparativa del efecto del Extrac to Pituitario de Carpa (EPC) y gonadotropina coriónica humana (hCG) en la reproducción inducida del bagre del Patía (*Rhamdia quelen*). Veterinary Zootechnician 4: 16-22.

Pradeep, P.J., Srijaya, T.C., Bahuleyan, A., Renjithkumar, C.R., Jose, D., Papini, A., Chatterji, A.K. 2012. Triploidy induction by heat-shock treatment in red tilapia. Caryologia 65: 152-156.

Recoubratsky, A.V, Gomelsky, B.I., Emelyanova, O.V, Pankratyeva, E.V. 1992. Triploid common carp produced by heat shock with industrial fish-farm technology. Aquaculture 108: 13-19.

Sampaio, E.V., Sato, Y. 2006. Biologia reprodutiva e desova induzida de duas espécies de bagres (Osteichthyes: Siluriformes) da bacia do rio São Francisco Acta Scientiarum. Biological Sciences 28: 263-268.

Shahjahan, R.M., Ahmed, M.J., Begum, R.A., Rashid, M.A. 2013. Breeding biology of guppy fish, *Poecilia reticulata* (Peters, 1859) in the laboratory. Journal of the Asiatic Society of Bangladesh 39: 259-267.

Turner, E., Montgomerie, R. 2002. Ovarian fluid enhances sperm movement in Arctic charr. Journal of Fish Biology 60: 1570-1579.

Watson, C.A., Hill, J.E., Graves, J.S., Wood, A.L., Kilgore, K.H. 2009. Use of a novel induced spawning technique for the first reported captive spawning of *Tetraodon nigroviridis*. Marine Genomics 2: 143-146.