اثر پرتوتابی گاما روی کیفیت اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*

غلامرضا شاه حسینی*

*پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، کرج ـ ایران

چکیده:

ماده‌زایی در آزاد ماهیان پرورشی به ویژه در قزل‌آلای رنگین‌کمان(*Oncorhynchus mykiss*) دارای اهمیت است که پیدا کردن شرایط پرتودهی اسپرم مهمترین قسمت برای شروع این فرآیند است. به منظور پیدا کردن بهترین دوز پرتو برای ماده‌زایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از چهار قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نر اسپرم‌گیری به عمل آمد . اسپرم‌ها با محلول کوهورت با نسبت ۱ به ۴ و به مقدار ۵ میلی‌لیتر در درون فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شدند و با دزهای ۴۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰، ۹۰۰ و ۱۰۵۰ گری پرتو گاما ساطع شده از کبالت ۶۰، پرتودهی گردیدند. پس از اتمام پرتوتابی، با استفاده از قطراتی از آب و سپس اضافه نمودن اسپرم روی لام در زیر میکروسکوپ نوری، میزان تحرک اسپرم‌ها اندازه‌گیری شدند. درصد تحرک با استفاده از لام نئوبار مورد شمارش و ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که دز ۴۵۰ گری دارای بیشترین درصد و مدت زمان تحرک است و بنابراین این دوز به عنوان دوز مناسب برای ماده‌زایی این گونه ماهی انتخاب گردید.

کلید واژه‌ها: اسپرم، ماده‌زایی، ماهی قزل آلای رنگین کمان، درصد و مدت زمان تحرک، پرتو گاما

Effect of gamma radiation on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* sperm quality

***Gholamreza shahhosseni**

* Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, I.R. of Iran

Abstract:

In order to find the best radiation dose rainbow trout sperm for gynogensis, sperm was taken from four pieces of male rainbow trout. Sperms were extracted into 15 ml falcons with cohort solution in a ratio of 1 to 4 at a rate of 5 ml and irradiated with gamma rays at doses of 450, 600, 750, 900 and 1050 Gy. After irradiation under an optical microscope, the sperms Percentage and time of motility was measured by adding water and then sperm on the slides was counted and evaluated. The results showed that the 450 Gy dose has the highest motility percentage and duration time among the other groups. Therefore, this dose was select as the appropriate dose for the gynogenesis in species of fish.

Keywords: sperm, gynogenesis, rainbow trout, percentage and duration of motility, gamma radiation

Email: ghshahhoseini@aeoi.org.ir

۱. مقدمه

ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss)* یکی از گونه‌های با ارزش است که زیستگاه اصلی آن رودخانه‌های ایالت متحده آمریکا می‌باشد. این ماهی با توجه به بازده، طعم و خصوصیات مناسب شرایط پرورشی در ایران و بسیاری از کشورهای جهان انتقال و به عنوان یک گونه پرورشی مطرح پرورش داده می‌شود [۳-۱].

امروزه برای افزایش بازده پرورشی این گونه از روش‌های نوین آبزی‌پروری استفاده می‌شود. با توجه یه بلوغ زود هنگام در آزادماهیان جنس نر و کاهش بازده تولید، همواره استفاده از جمعیت تمام ماده به عنوان رویای پرورش‌دهندگان ماهی بوده است. بنابراین از روش‌های متعددی برای تولید جمعیت تمام ماده این گونه ماهی استفاده می‌شود که یکی از این روشها استفاده از پرتوتابی اسپرم می‌باشد. برای این منظور محتوای ژنوم با استفاده از پرتوتابی تخریب و تنها از آن به عنوان فعال‌کننده ادامه تقسیم سلولی میوزی تخمک استفاده می‌شود. پرتوهای یونیزان و به ویژه پرتو گاما، جهت تخریب ژنوم اسپرم دارای اهمیت زیادی می‌باشند [۶-۳]..

در این روش از رقیق‌کننده ها به ویژه محلول کوهورت در زمان پرتودهی استفاده می‌شود. سنجش کیفیت اسپرم دارای اهمیت زیادی است و برای سنجش آن از آزمایشات متعددی استفاده می‌شود که در این بین درصد و مدت زمان تحرک داری اهمیت و ارزش بالایی می‌باشد. این تحقیق با هدف بررسی کیفیت و انتخاب دز پرتوتابی اسپرم بعد از تابش توسط دزهای مختلف پرتو گاما، انجام گردید.

۲. روش کار

محلول کوهورت (۲۰ میلی مولار تریس ، ۵۰ میلی مولار گلایسین، ۶٪ NaCl ، ۲٪ kCl pH = 9) تهیه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد اتوکلاو شد. چهار قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نر از شرکت ماهی سرای البرز کاسپین تهیه شد و به پژوهشکده کشاورزی هسته ای منتقل شد. پس از سازگاری ۱ هفته‌ای و بعد از ۲۴ ساعت گرسنگی، ماهیان در محلول تهیه شده با پودر گل میخک (۲۰۰ppm) بیهوش شدند و اقدام به استحصال مایع اسپرمی از آنها شد. در ابتدا مایع بدست آمده از هر ماهی از نظر درصد و مدت زمان تحرک به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های دارای تحرک بیش از ۸۰ درصد انتخاب و با هم مخلوط شدند. بخشی از مخلوط به دست آمده به نسبت ۱ به ۴ با محلول کوهورت رقیق و به ۶ فالکون ۱۵ میلی‌لیتری برای پرتوتابی با دزهای ۰، ۴۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰، ۹۰۰ و ۱۰۵۰ گری منتقل شدند. نمونه‌های مربوط به تیمار صفر (کنترل) به یخچال دمای ۴ درجه سانتیگراد منتقل شدند و سایر نمونه‌ها روی یخ در دمای ۴ درجه سانتیگراد به ظرف پرتوتابی منتقل و در معرض پرتوی گاما قرار

گرفتند. پس از رسیدن به هر دز مورد نظر، نمونه مربوطه از ظرف پرتوتابی خارج و روی یخ به آزمایشگاه منتقل می‌شد و ادامه پرتوتابی در باقی نمونه‌ها صورت پذیرفت. برای اندازه گیری مدت زمان و درصد تحرک اسپرم به صورت چشمی ۳۰۰ میکروگرم آب توسط پیپت روی لام قرار داده شد و سپس بعد از آماده شدن نمونه‌های هر دوز اسپرم ۵۰ میکروگرم اسپرم توسط پیپت به لام منتقل و با آب مخلوط و بلافاصله مدت زمان (زمانی که ۱۰۰ درصد اسپرمها از حرکت بایستند) و درصد تحرک اسپرم در قسمت‌های مختلف لام مورد اندازه‌گیری و شمارش قرار می‌گرفت.

۱.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنف بررسی شد. داده‌های درصدی پیش از انجام آنالیزها با (Arc sin) تبدیل شدند. برای مقایسه میانگین داده‌ها از تجزیه واریانس یک‌طرفه (ONE-WAY-ANOVA) استفاده شد و سطح معنی‌دار بودن در بین تیمارها از طریق آزمون Tukey در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید. تجزیه و تحلیل آماری به وسیله نرم‌افزار SPSS 17 در محیط ویندوز انجام پذیرفت و برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Excel 2007 در محیط ویندوز استفاده شد.

۳. نتایج

نتایج نشان داد مدت زمان و درصد تحرک اسپرم در تیمار شاهد بالاترین میزان را داشت. در بین دزهای مورد بررسی دز ۴۵۰ گری دارای بیشترین زمان و درصد تحرک اسپرم بود. درصد تحرک اسپرم بین گروه ۶۰۰ و ۷۵۰ گری اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p>۰/۰۵$) و گروه ۶۰۰ گری کمترین درصد تحرک را دارا بود. همچنین بین درصد تحرک گروه ۹۰۰ و ۱۰۵۰ گری اختلاف آماری معنی داری ملاحظه نشد ($p>۰/۰۵$). بیشترین درصد تحرک در بین دزهای پرتوتابی مربوط به گروه ۴۵۰ گری بود. بیشترین مدت زمان تحرک مربوط مربوط به گروه ۴۵۰ گری بود و بین این گروه و گروه ۹۰۰ گری اختلاف آماری معنی داری ملاحظه نشد ($p>۰/۰۵$).

جدول ۱- درصد و مدت زمان تحرک اسپرم در نمونه پرتودهی شده با (۰، ۴۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰، ۹۰۰ و ۱۰۵۰ گری)

	مدت زمان تحرک (ثانیه)	درصد تحرک (٪)
شاهد (۰)	۵۹/۳±۴/۴[e]	۸۷/۶±۴/۱[d]
۴۵۰ گری	۴۶/۴±۳/۶[d]	۶۷/۴±۱/۹[c]
۶۰۰ گری	۲۳/۳±۴/۹[b]	۱۴/۳±۴/۴[a]

	مدت زمان تحرک (ثانیه)	درصد تحرک (٪)
۷۵۰ گری	۱۴/۵±۳/۹[a]	۱۱/۶±۹/۱[a]
۹۰۰ گری	۴۶/۷±۱/۴[d]	۴۸/۶±۱/۷[b]
۱۰۵۰ گری	۳۹/۲±۷/۴[c]	۴۹/۵±۴/۴[b]

اعداد (SD ± میانگین) در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار هستند (P< ۰/۰۵)

۴. بحث

قبل از انجام عملیات تکثیر و بالاخص ماده‌زایی سنجش کیفیت اسپرم دارای اهمیت و ارزش زیادی است که در بین کلیه شاخص‌های فیزیکی، بیوشیمیایی درصد و مدت زمان تحرک با هدف تکثیر ماهی دارای ارزش زیادی است. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان تحرک و درصد تحرک در گروه پرتو دیده با دز ۴۵۰ گری بالاتر از سایر گروه‌ها بود که این نتیجه با سایر اطلاعات مربوط به مطالعات دیگر همخوانی دارد [۱۲-۶]. با توجه به مطالعات قبلی کاهش فعالیت اسپرم در دزهای بین ۶۰۰ و ۷۵۰ گری می‌تواند به دلیل پدیده باقیماندن قطعات کروموزوم اسپرم تخریب نشده (Paternal Chromosome Contamination) به وسیله پرتو گاما باشد. [۱۳].. اما برای پاسخ دقیق به علت این اتفاق باید مطالعات بیشتری صورت گیرد.

در اکثر گونه‌های ماهی سلولهای اسپرم باید در مدت زمان کوتاهی (چند ثانیه تا چند دقیقه) به میکروپایل تخمک برسند، به این معنی که تاژک آنها باید بلافاصله در تماس با آب کاملا فعال شود (در واقع اختلاف اسمزی محیط بیرون و داخل اسپرم منجر به فعال شدن پمپ سدیم-پتاسیم شده و منجر به تحریک تامین انرژی مورد نیاز حرکت تاژک موجود در میتوکندری گردن اسپرم می‌گردد). هیدرولیز ATP تنها منبع حرکت مکانیکی تاژک است. اسپرماتوزوئیدها به سرعت غیر فعال می‌شوند، زیرا میتوکندری نمی‌تواند چنین انرژی را جبران کند، در نتیجه حرکت اسپرم متوقف می‌شود [۱۴]. . در زمان عملیات پرتوتابی اسپرم هدف از بین رفتن ژنوم و البته با حفظ سلامت قسمت میانی و دم است، زیرا تحریک تخمک توسط اسپرم با ژنوم تخریب شده هم انجام می‌گیرد [۱۵]. بعد از ورود اسپرم به تخمک از طریق سوراخ میکروپیل، گویچه قطبی دوم خارج می‌شود که می‌توان با استفاده از شوک‌های مختلف دمایی، فشار و شیمیایی مانند استفاده از گلشی‌سین مانع از خروج آن شده و از آن به عنوان ژنوم جایگزین ژنوم تخریب شده اسپرم در لقاح استفاده می‌گردد. در یک حجم مشخص اسپرم هر چه مدت زمان تحرک و درصد اسپرم های دارای فعالیت پایین، بیشتر باشند شانس ورود و تحریک تخمک و ادامه تقسیم سلولی و خروج گویچه قطبی دوم بیشتر است. بنابراین در زمان پرتوتابی و

یا استفاده از هر نوع محرک خارجی، اسپرمی که دارای بیشترین درصد و مدت زمان تحرک است انتخاب می‌شود [۱۷-۱۶].

در سال‌های اخیر حجم بالایی از بیماری‌های آبزیان همانند VHS، IPN و IHN همراه با تخم‌های وارداتی از سایر کشورها به ایران وارد شده است که همین موضوع، موجب فلج‌شدن بخش زیادی از این صنعت شده است [۱۸، ۱۹]. بنابراین استفاده از روش‌های مناسب در جهت خودکفایی و تولید تخم چشم‌زده و ماهیان تک جنس ماده و بومی در کشور امری ضروری می‌باشد.

۵. نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطلوب گروه اسپرم پرتودهی شده با دز ۴۵۰ گری، این دز به عنوان دز مناسب پرتودهی اسپرم با هدف ماده‌زایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انتخاب می‌شود. اما برای تحقیقات بعدی می‌توان اثر پرتوتابی اسپرم را در سطوح دیگری از جمله ارزیابی اسپرم، خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی اسپرم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار داد.

۶. تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران محترم و کارکنان ساعی پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای که به هر طریق در پیشرفت این پژوهش تأثیرگذار بودند به ویژه جناب آقایان دکتر نیسی، دکتر نبی‌پور، و مهندس مجیدی تقدیر به عمل می‌آید.

۶. مراجع

۱..Benfey, T., J, A.M. Sutterlin, and R.J. Thompson, Use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids. Can J Fish Aquat Sci, 1984. 41 :p. 980-984.
۲.Billard, R., L'insrmination artificielle de la truite Salmo gairdneri R. 4. Effet des ions K et Na sur la conservation de la fertilit6 des gametes. Bull Fr Pisc, 1974. 256: p. 88-100.
۳.Piferrer, F., Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture, 2001. 197: p. 229-281.
۴.Devlin, H.R. and Y. nagahama, Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental inf luences. Aquaculture, 2002. 208: p. 19.۱-۳۶۴
۵.Mank, J.E. and J.C. Avise, Evolutionary diversity and turn-over of sex-determination in teleost fishes. Sexual Development 2009. 3((2-3)): p. 60-67.
۶.Matsuda, M., et al., Oryzias curvinotus has DMY, a gene that is required for male development in the medaka, O. latipes. Zoological Sciences. 2003. 20(2): p. 159-161.

۷.Matsuda, M., et al., DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America .۲۰۰۷ :(۱۰۴)۱۰p. 3865-3870.
۸.Myosho, T., et al., Tracing the emergence of a novel sexdetermining gene in medaka, Oryzias luzonensis. Genetics 2012. 191(1): p. 163-170.
۹.Kamiya, T., W, et al., A Trans-Species Missense SNP in Amhr2 Is Associated with Sex-determination in the Tiger Pufferfish, Takifugu rubripes (Fugu). PLoS Genetics, 2012. 8(7): p. e1002798.
۱۰.Yano, A., et al., The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids .Evolutionary Applications, 2012: p. 1752-4571.
۱۱.Philips, R.B. and G.H. Thorgaard, Polymorphism and differentiation of rainbow trout Y chromosomes. Genome, 2004. 47: p. 1105-1113.
۱۲.Dorafshan, S. and M.R. Kalbassi, Effects of triploidy on the Caspian salmon Salmo trutta caspius haematology. Fish Physiol Biochem, 2008. 34: p. 195-200.
.
۱۳ T. J. Pandian & R. Koteeswaran, Ploidy induction and sex control in fish. Hydrobiologia, 1998. 384: 167–243
۱۴. Borys Dzyuba, Olga Bondarenko, Pavel Fedorov, Ievgeniia Gazo, Galina Prokopchuk, Jacky Cosson .Energetics of fish spermatozoa: The proven and the possible. aquaculture. 2016. 241(2). 41-87
۱۵AOAC, Official Methods of Analyses, 15th edition. Association of Official Analytical Chemists ed. K. Helrich. 1990: Inc., Arlington, VA.
۱۶.Wiegertjes, G.F.S.R.J.M ,.Van Muiswinkel.W. B Divergent selection for antibody production in common carp (Cyprinus carpio L.) using gynogenesis. Animal Genetics, 1994. 25: p. 251-257.
۱۷.Hashimoto, K., T. Nakanishi, and Y. Kurosawa, Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990. 87(17): p. 6863-6867.
۱۸..Fadaeifard, F., et al., Evaluation of infectious hematopoietic necrosis, infectious pancreatic necrosis and viral hemorrhagic septicemia viruses in Iranian and imported rainbow trout eggs: across sectional study. Journal of Veterinary Research, 2012. 67(4): p. 393-399.
۱۹.Omoto, N., et al., Sex ratio of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (Huso huso female X Acipenser ruthenus male). Aquaculture, 2005. 245: p. 39-47..