

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی
شهید مطهری یاسوج

عنوان :

بررسی شاخص های کیفی اسپرم
ماهی قزل آلا و اثر جیره های
مختلف غذایی بر بهبود کیفیت آن

مجری:

علیرضا قاندى

شماره ثبت

۵۰۸۰۲

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح ماهیان سردآبی
شهید مطهری یاسوج

عنوان پروژه : بررسی شاخص های کیفی اسپرم ماهی قزل آلا و اثر جیره های مختلف غذایی بر بهبود کیفیت آن

شماره مصوب پروژه : ۹۲۱۱۷-۱۲-۱۲-۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : علیرضا قاندى

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : علیرضا قاندى

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : عباس متین فر، حسین عبدالحی، عین ا... گرجی پور، اسماعیل کاظمی،

منصور شریفیان، حبیب ا... گندمکار، ابوالحسن راستیان نسب، سید حسین مرادیان، داوود ضرغام، رقیه

محمودی، طیبه باشتی، عبدالحمید حسینی، میثم صلاحی، سجاد نظری

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -

محل اجرا : استان کهگیلویه و بویراحمد

تاریخ شروع : ۹۲/۱/۱

مدت اجرا : ۲ سال و ۳ ماه

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۵

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسؤل / مجری»

پروژه : بررسی شاخص های کیفی اسپرم ماهی قزل آلا و اثر جیره

های مختلف غذایی بر بهبود کیفیت آن

کد مصوب : ۹۲۱۱۷-۱۲-۱۲-۲

شماره ثبت (فروست) : ۵۰۸۰۲ تاریخ : ۹۵/۹/۱۷

با مسؤلیت اجرایی جناب آقای علیرضا قائدی دارای مدرک تحصیلی

دکتری تخصصی در رشته تغذیه آبزیان می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش اصلاح نژاد و تکثیر و پرورش آبزیان

در تاریخ ۹۵/۶/۲ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده □ مرکز ■ ایستگاه

با سمت معاون تحقیقاتی در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان

سردآبی شهید مطهری یاسوج مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده	۱.....	۱
۱- مقدمه	۲.....	۲
۲- مواد و روشها	۵.....	۵
۲-۱- مشخصات محل انجام تحقیق	۵.....	۵
۲-۲- تیمارهای آزمایشی	۵.....	۵
۲-۳- غذا و غذادهی	۵.....	۵
۲-۴- آنالیز غذا	۶.....	۶
۲-۵- تعیین ترکیب اسیدهای آمینه جیره غذایی	۷.....	۷
۲-۶- ماهیان مورد آزمایش	۸.....	۸
۲-۷- جمع آوری اسپرم	۹.....	۹
۲-۸- فاکتورهای مورد بررسی	۹.....	۹
۲-۹- آنالیز آماری	۱۲.....	۱۲
۳- نتایج	۱۳.....	۱۳
۳-۱- پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب	۱۳.....	۱۳
۳-۲- اثر تیمارهای مختلف غذایی بر آنزیمهای مایع اسپرمی	۱۳.....	۱۳
۳-۳- اثر تیمارهای مختلف غذایی بر ترکیبات غیر آلی (یونها) مایع اسپرمی	۱۴.....	۱۴
۳-۴- اثر تیمارهای مختلف غذایی بر ترکیبات آلی مایع اسپرمی	۱۵.....	۱۵
۳-۵- اثر تیمارهای مختلف غذایی بر pH مایع اسپرمی	۱۶.....	۱۶
۳-۶- همبستگی بین پارامترهای مورد بررسی	۱۶.....	۱۶
۴- بحث و نتیجه گیری	۱۸.....	۱۸
۴-۱- اثر تیمارهای مختلف غذایی بر آنزیمهای مایع اسپرمی	۱۸.....	۱۸
۴-۲- اثر تیمارهای مختلف غذایی بر ترکیبات غیر آلی (یونها) مایع اسپرمی	۲۰.....	۲۰
۴-۳- اثر تیمارهای مختلف غذایی بر ترکیبات آلی مایع اسپرمی	۲۲.....	۲۲
۴-۴- اثر تیمارهای مختلف غذایی بر pH مایع اسپرمی	۲۴.....	۲۴
۴-۵- همبستگی بین پارامترهای مورد بررسی	۲۵.....	۲۵
پیشنهادها	۲۷.....	۲۷
منابع	۲۸.....	۲۸
چکیده انگلیسی	۳۲.....	۳۲

چکیده

در پژوهش حاضر، اثر غلظت های مختلف آرژنین بر پارامترهای بیوشیمیایی و آنزیم های (شامل لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP)، آهن، منیزیم، فسفر، کلراید، کلسیم، سدیم، پتاسیم، کلسترول، اسیداوریک، اوره، فروکتوز، گلوکز، پروتئین کل و pH) مایع اسپرمی قزل آلا ی رنگین کمان (*O.mykiss*) بررسی شد. برای این منظور ۵ تیمار غذایی (هر یک با ۳ تکرار) شامل سطوح صفر (تیمار شاهد)، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد وزنی اسید آمینه آرژنین در نظر گرفته شد. مولدین به مدت ۹۰ روز با تیمارهای فوق غذادهی شده و در پایان دوره آزمایش از هر تکرار یک قطعه ماهی مولد نر (از هر تیمار ۳ قطعه) برای استحصال اسپرم استفاده شد. در نهایت نتایج حاصل تفاوت آماری معنی داری را در میزان LDH، ALP، آهن و فسفر مایع اسپرمی مولدین در بین هیچ یک از تیمارها نشان نداد. کمترین میزان آنزیم های AST و ALT و بیشترین میزان یون های کلسیم و منیزیم در تیمار ۱/۵٪ گزارش شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی داری را نشان داد ($p < 0/05$). همچنین میزان یون های کلراید، سدیم و پتاسیم در مایع اسپرمی مولدینی که جیره حاوی آرژنین مصرف کرده اند نسبت به تیمار شاهد به صورت معنی داری بالاتر بود. با افزایش درصد آرژنین در جیره های غذایی میزان اسیداوریک افزایش و میزان اوره و گلوکز به صورت معنی دار کاهش پیدا کرد. بیشترین میزان فروکتوز، پروتئین کل و کلسترول به ترتیب در تیمارهای ۰/۵٪، ۱٪ و ۲٪ آرژنین مشاهده گردید که با سایر تیمارها اختلاف معنی داری را نشان دادند ($P < 0/05$). بالاترین میزان pH نیز در تیمار ۱/۵٪ گزارش شد. نتایج حاصل از بررسی ضریب همبستگی پیرسون بین یون های کلسیم و منیزیم و یون سدیم با یون های پتاسیم و کلراید به ترتیب ($p < 0/01$ ، $r = 0/750$ ، $r = 0/769$ و $r = 0/938$) همبستگی مثبت معنی داری را نشان داد. از سوی دیگر بین کلسترول با کلراید، سدیم، پتاسیم، ALT و LDH به ترتیب ($p < 0/01$ ، $r = -0/728$ و $r = -0/724$ ، $r = -0/531$ و $r = -0/560$) همبستگی منفی معنی دار و همچنین بین یون های پتاسیم و کلراید ($p < 0/01$ ، $r = 0/836$) همبستگی مثبت معنی دار مشاهده شد. در مجموع براساس نتایج به دست آمده، با توجه به کاهش آنزیم ها و افزایش اکثر یون ها در تیمار ۱/۵٪ آرژنین می توان افزایش این مقدار آرژنین را برای بهبود کیفیت اسپرم ماهیان قزل آلا به منظور افزایش راندمان تکثیر این ماهیان به جیره غذایی مولدین قزل آلا ی رنگین کمان توصیه نمود.

کلمات کلیدی: قزل آلا ی رنگین کمان، آرژنین، مایع اسپرمی، پارامترهای بیوشیمیایی

۱- مقدمه

به رغم پیشرفت‌های چشمگیر انسان طی قرون متمادی، امروزه مسائل و مشکلات فراوانی زندگی بشر را تهدید می‌کند. در این میان مسئله تغذیه و تأمین غذای سالم و کافی از بدوخلقت تاکنون مهمترین مسئله‌ی حیاتی انسان بوده است. این موضوع از نظر اقتصادی و اجتماعی در درجه اول اهمیت قرار گرفته، بطوری که سطح تمدن و درجه پیشرفت هر جامعه‌ای از چگونگی و کیفیت تغذیه افراد آن جامعه مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. ماهی و فرآورده‌های غذایی حاصل از آن از جمله غذاهایی است که در سال‌های اخیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (ابراهیمی و بیرقدار، ۱۳۸۵)

افزایش تقاضا برای مصرف ماهی در سراسر جهان به گونه‌ای بوده است که صید و بهره‌برداری از ذخایر وحشی و منابع طبیعی آن از اواخر قرن گذشته قادر به برآورد این نیازها نبوده است (بوئنلو و همکاران، ۲۰۰۷). لذا بهبود و توسعه فعالیت‌های آبرزی‌پروری به عنوان یک راهکار مهم در تأمین نیازهای غذایی انسان می‌تواند بیشتر مورد توجه واقع شده و پاسخگوی تقاضای روبه افزایش ماهیان خوراکی باشد.

در طی ده سال گذشته تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلا در کشور ما از اهمیت زیادی برخوردار گردیده و مزارع متعددی در کشور احداث شده است. بروز مشکلات متعدد از یک سو و توجه به راندمان اقتصادی بهتر ضرورت انجام تحقیقات در زمینه‌های مختلف به ویژه تکثیر و تغذیه این گونه باارزش را بیش از پیش نمایان می‌سازد (سلیمی خورشیدی و همکاران، ۱۳۹۱)

. تغذیه مولدین و الگوهای تولید مثلی انواع آبریان و اطلاعات ما در زمینه نیازهای غذائی به ریز مغذی‌ها نقش مهمی در افزایش بهره‌وری دارد.

شواهد اخیر نشان می‌دهد که برخی اسیدهای آمینه و متابولیت‌های آنها تنظیم‌کننده‌های مهم مسیرهای متابولیکی کلیدی هستند که برای نگهداری، رشد، دریافت غذا، مصرف مواد مغذی، ایمنی، رفتار، دگرذیسی لاروی، تولیدمثل و همچنین مقاومت در برابر عوامل استرس‌زای محیطی و عوامل بیماری‌زا در ماهیان مختلف ضروری هستند (هوانگ و ایدلر، ۱۹۶۹)

مطالعه درمورد آرژنین اولین بار در عراق برای تحریک اسپرم بز در آزمایشگاه انجام شد (العبادی و همکاران، ۲۰۱۲). آرژنین در ساختار اسپرم نقش داشته و به عنوان جز اساسی در ساختار نوکلئوپروتئین اسپرم گونه‌های مختلف جانوران یافت شده است. آرژنین مانع از پراکسیداسیون لایه غشا فسفولیپید تحت شرایط مختلف پراکسیداسیون از طریق مکانیسم تولید نیتریک اکساید می‌شود و در نتیجه تمامیت ساختار و عملکرد اسپرم‌ها را محافظت می‌کند، همچنین تحرک اسپرم را از طریق بهبود میزان گلیکولیز که باعث افزایش نرخ سنتز آدنوزین تری فسفات و تولید لاکتات در اسپرم می‌شود را ترقی می‌دهد. بنابراین نقش حیاتی در حفظ فعالیت متابولیکی آن در دستگاه تناسلی ایفا می‌کند.

تولید تجاری ماهیان ایجاب می کند که کیفیت مواد تناسلی در ماهیان مولد ارزیابی شود، به عبارتی، قابلیت لقاح مصنوعی در آنها افزایش یابد (حسینی و همکاران، ۱۳۸۹). فعالیت های کشت و پرورش ماهی تاکنون بیشتر بر کیفیت تخمک ها و لاروها تکیه داشته است تا اینکه به اسپرم توجه کند درحالی که کیفیت هر دو گامت یعنی اسپرم و تخمک بر موفقیت لقاح و بازماندگی لاروها تأثیر گذار است. در بعضی از گونه ها کیفیت ضعیف اسپرم می تواند به عنوان یک فاکتور محدود کننده در پرورش آنها بروز کند (حسینی و همکاران، ۱۳۸۸). با این حال حتی زمانی که موفقیت لقاح بالا است، تفاوت در کیفیت اسپرم بین نرهایی که مخلوط اسپرم آنها استفاده شده است ممکن است به شدت اندازه ظاهری جمعیت را کاهش داده و بر یکپارچگی ژنتیکی ذخائر آینده تأثیر گذار باشد (رورانگوا و همکاران، ۲۰۰۴).

در مزرعه پرورش ماهی برای تخمین موفقیت تولید مثل کنترل مولدین نر ضروری است. با این حال مطالعه در خصوص تحرک اسپرم ماهی به گونه هایی با بهره وری تجاری بالا و یا گونه هایی که نسل آنها مورد حفاظت قرار میگیرند. محدود شده است. هرچند در سال های اخیر مطالعه بر روی ویژگی های تولید مثلی نرها به طور چشمگیری افزایش یافته است (فلیپ و همکاران، ۲۰۰۹)

کیفیت اسپرم را می توان به عنوان توانایی آن در بارور ساختن تخمک و متعاقباً ایجاد یک سلول جنین طبیعی تعریف کرد. در طبیعت یا در شرایط آبی پروری کیفیت گامت های ماهی می تواند بسیار متغیر باشد. این تغییرات تحت تأثیر فاکتورهای محیطی یا فعالیت های مدیریتی مربوط به پرورش مولدین و همچنین فاکتورهای ژنتیکی است. به همین دلیل موضوع کیفیت گامت در صنعت آبی پروری به توجه بیشتری نیاز دارد. در کل شناخت اندکی در مورد مکانیزم های سلولی و مولکولی درگیر در کنترل کیفیت اسپرم و تخمک وجود دارد (باب و لابه، ۲۰۱۰).

مطالعه ساختار و مورفولوژی اسپرم ماهی اطلاعاتی را برای درک طبقه بندی آنها و روابط تکاملی در خانواده، سطوح زیر خانواده و گونه ها، همچنین برای مطلوب سازی تکثیر مصنوعی، جلوگیری از مشکلات پلی اسپرمی و پیشرفت تکنیک های انجماد فراهم می کند. انجام مطالعات در مورد ویژگی های اسپرم برای درک فرایندهای بیوشیمیایی که در تحرک اسپرم و طی باروری رخ می دهند، همچنین ارزیابی توانایی های تولید مثلی گونه های ماهیان مختلف و بهبود روش هایی برای ذخیره سازی کوتاه مدت و بلند مدت اسپرم ماهی ضروری است (صدیق و اختر، ۲۰۱۱).

کیفیت مایع اسپرمی از فاکتورهایی است که می تواند میزان لقاح را تحت تأثیر قرار دهد و می توان از آن به عنوان عامل مؤثر در باروری تخمک ها نام برد پارامترهای متفاوتی از قبیل مدت زمان تحرک، حرکت روبه جلو، ترکیبات مایع اسپرمی و اسپرماتوکریت، محتوی ATP، میزان یون های موجود در مایع اسپرمی، فعال کننده ها، ترکیبات مایع اسپرمی و ... از عواملی هستند که می توانند کیفیت اسپرم را تحت تأثیر قرار دهند (حسینی و همکاران، ۱۳۸۸).

مایع اسپرمی نقش حیاتی در متابولیسم اسپرم، عملکرد، بقا و تحرک آن دارد. یون‌هایی همچون سدیم، پتاسیم و کلر در مایع اسپرمی ایجاد تعادل اسمزی می‌کند، درحالی‌که عناصر کمیاب ضروری اجزای بسیاری از آنزیم‌های مهم هستند. بنابراین ارزیابی بیوشیمیایی مایع اسپرمی یک معیار مهم برای ارزیابی کیفیت اسپرم و توانایی آن است. ساختار اسپرم و ترکیب بیوشیمیایی مایع اسپرمی ممکن است درون خانواده‌ها بیشترین یا کمترین تنوع را داشته باشد.

به منظور کنترل و موفقیت تولید در سیستم‌های آبی‌پروری، داشتن دانش کافی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مایع اسپرمی و ساختار اسپرم ماهیان بسیار مهم است (ورما و همکاران، ۲۰۰۹) در همین راستا هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیر استفاده از اسید آمینه آرژنین در جیره بر کیفیت مایع اسپرمی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مشخصات محل انجام تحقیق

این تحقیق در پاییز و زمستان ۱۳۹۳ در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی (شهید مطهری یاسوج) شهرستان یاسوج به اجرا درآمد. مرکز مذکور در سال ۱۳۶۴ در ۲۶ کیلومتری جنوب یاسوج، مرکز استان کهگیلویه و بویر احمد در مسیر جاده یاسوج به گچساران در روستای تنگاری واقع در منطقه دشتروم در زمینی به مساحت ۴/۵۰ هکتار، توسط شرکت سهامی شیلات ایران احداث گردید. این منطقه با ارتفاع ۱۸۵۰ متر از سطح دریا دارای زمستان های سرد و برف گیر و تابستانی مطبوع و دلپذیر می باشد. آب مورد نیاز مرکز از فاصله ۶۰۰ متری توسط چشمه تامین می گردد. سطح مفید استخرهای این مرکز معادل ۱/۳۰ هکتار به صورت ۷۴ واحد استخر (۳×۲۷ متر) می باشد. ظرفیت اسمی این مرکز تولید ۱۱ میلیون تخم چشم زده در سال است.

۲-۲- تیمارهای آزمایشی

این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی (CRD) با پنج تیمار و سه تکرار شامل ۱۵ واحد آزمایشی و تعداد ۸ ماهی مولد در هر استخر و در مدت زمان ۱۲ هفته انجام گرفت. در طول آزمایش دمای آب ۹/۸ درجه سانتی گراد، پی اچ ۷/۱ و دوره نوری نرمال مورد استفاده قرار گرفت. تیمارها شامل: تیمار ۱ (بدون افزودن آرژنین در جیره غذایی (تیمار شاهد)، تیمار ۲ (۰/۵ درصد آرژنین)، تیمار ۳ (۱ درصد آرژنین)، تیمار ۴ (۱/۵ درصد آرژنین) و تیمار ۵ (۲ درصد آرژنین) در جیره غذایی ماهیان قزل آلا ی رنگین کمان مولد بود. آرژنین با درصد های مختلف در فرمول متعادل و به مواد اولیه اضافه گردید.

۲-۳- غذا و غذادهی

فرمول جیره های مورداستفاده در آزمایش براساس جداول استاندارد احتیاجات غذایی NRC تنظیم شده، مواد اولیه آن از شرکت کیمیاگران تغذیه واقع در شهرکرد تهیه و با استفاده از دستگاه پلت زن (قطر ۵ میلی متر) و طی مراحل استاندارد در دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان تولید و سپس مورد آنالیز شیمیایی قرار گرفت. نسبت اقلام و ترکیب شیمیایی جیره های غذایی در جدول ۱-۱ آمده است. در طول دوره آزمایش، غذادهی به طور ثابت و به میزان ۲٪ وزن بدن مولدین در هر استخر انجام گرفت. این میزان غذا به صورت دو وعده یکسان در ساعت های ۸ صبح و ۴ بعد از ظهر در استخرهای پرورش مولدین قزل آلا ی رنگین کمان توزیع گردید. در این قسمت داور محترم تقاضای ارائه رفرنس نموده اند که ضرورتی ندارد. مولدین طبق جدول غذادهی باید ۲٪ وزن غذادهی شوند.

۴-۲- آنالیز غذا

ترکیب جیره‌های غذایی با استفاده از روش‌های استاندارد آنالیزهای^۱ AOAC (2002)، شامل درصد رطوبت (خشک کردن با آون)، خاکستر (روش سوزاندن خشک)، پروتئین (تعیین نیتروژن کل به روش کج‌جدال) و چربی (حل کردن چربی در اتر و تعیین مقدار آن به روش سوکسله) تعیین گردید. آنالیز شیمیایی غذا و پروفایل آمینو اسیدها در جداول ۱-۲ و ۲-۲ و دستگانه‌های مورداستفاده در این آزمایش‌ها در جدول شماره ۳-۲ آورده شده است.

جدول ۱-۱: نسبت اقلام و ترکیب شیمیایی جیره‌های غذایی

تیمار شاهد	تیمار ۵٪	تیمار ۱٪	تیمار ۱.۵٪	تیمار ۲٪	ترکیب
۴۵	۴۵	۴۵	۴۵	۴۵	آردماهی
۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	کنجاله سویا
۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	گلوتن گندم
۵	۴/۵	۴/۵	۴/۵	۴	رش برنج
۵	۵	۴/۵	۴	۴	آرد ذرت
۲	۲	۲	۲	۲	مخمر
۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	ژلاتین
۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	کازئین
۳/۵۰	۳/۵۰	۳/۵۰	۳/۵۰	۳/۵۰	روغن ماهی
۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	متیونین
۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	لیزین
۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	CMC
۲	۲	۲	۲	۲	مکمل ویتامینی
-	۰/۵۰	۱	۱/۵۰	۲	آرژنین
ترکیب شیمیایی					
۵۲/۱۸	۵۲/۲۴	۵۲/۵۹	۵۲/۶۷	۵۲/۷۷	پروتئین
۱۲/۴۰	۱۲/۰۷	۱۲/۶۰	۱۲/۱۰	۱۲/۰۹	چربی
۸/۵۰	۹/۴۴	۸/۶۹	۹/۳۹	۹/۸۲	خاکستر
۵	۵	۶	۶	۶	رطوبت

در این قسمت داور محترم مرقوم داشته اند ترکیب غذایی در کلیه تیمارها باید یکسان باشند و فقط اسید آمینه آرژنین تغییر کند. در جیره فوق ترکیب غذایی کاملاً یکسان است.. پروتئین، چربی و میزان مصرف اقلام غذایی کاملاً بالانس شده است. اما تفاوت در آرژنین وجود دارد. همچنین داور محترم درخواست ارائه اطلاعات در

¹ Association of analytical chemists

خصوص زمان ماندگاری اسپرم، حجم اسپرم و درصد سلول های زنده را نموده اند که در چکیده به دلیل تغییر تحقیق اشاره شد.

۵-۲- تعیین ترکیب اسیدهای آمینه جیره غذایی

برای اندازه گیری ترکیب اسیدهای آمینه جیره های غذایی، نمونه هایی از آنها برای آنالیز و تعیین ترکیب اسیدهای آمینه به دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس فرستاده شد و توسط دستگاه HPLC و با روش ارائه شده توسط لندورف و موپر، ۱۹۷۹ اندازه گیری گردید. نتایج حاصل در جدول ۲-۲ درج شده است.

جدول ۲-۲: ترکیب اسیدهای آمینه جیره غذایی استفاده شده در آزمایش (گرم بر ۱۰۰ گرم پروتئین)

اسیدهای آمینه	تیمارشاهد	تیمار ۰/۵٪	تیمار ۱٪	تیمار ۱/۵٪	تیمار ۲٪
آسپارتیک اسید	۹/۳۴	۹/۱۴	۸/۲۵	۲/۹۰	۸/۲۸
گلوتامیک اسید	۲۴	۱۹/۲۵	۱۸/۳۱	۱۹/۳۰	۲۱/۱۳
سرین	۶/۱۸	۷/۲۱	۶/۹۹	۶/۹۸	۷/۴۸
هیستیدین	۱/۰۵	۱/۰۲	۱/۱۰	۱/۲۲	۰/۹۶
گلیسین*	۱/۶۰	۱۴/۴۹	۱۴/۶۱	۱۴/۴۱	۱۴/۳۷
ترئونین*	۹/۳۶				
آرژنین	۵	۵/۲۹	۵/۷۳	۶/۳۶	۷/۱۶
تورین	۱/۱۶	۱/۲۲	۱/۲۲	۱/۳۳	nd
آلانین	۶/۵۲	۷/۴۵	۶/۹۰	۷/۸۴	۶/۳۷
تیروزین	۲/۶۷	۲/۷۲	۲/۵۰	۲/۵۳	۲/۵۶
متیونین*	۲/۵۷	۹/۳۹	۱۰/۵۵	۹/۷۶	۹/۶۵
والین*	۷/۷۴				
فنیل آلانین	۴/۰۲	۳/۹۰	۳/۹۰	۳/۶۳	۳/۶۸
ایزولوسین	۵/۷۴	۴/۹۵	۵/۶۰	۵/۳۱	۵/۲۴
لوسین	۸/۶۳	۸/۵۸	۸/۵۰	۸/۰۴	۸/۰۳
لیزین	۲/۷۳	۳/۰۹	۲/۹۶	۲/۶۳	۲/۴۸
مجموع اسیدهای آمینه	۹۸/۳۱	۹۷/۷۰	۹۷/۱۲	۹۸/۵۴	۹۷/۳۹
مجموعه اسیدهای آمینه ضروری	۵۱/۴۷	۴۸/۵۹	۴۵/۷۷	۴۸/۷۸	۴۷/۴۲
مجموع اسیدهای آمینه غیر ضروری	۴۶/۸۴	۴۹/۱۱	۵۱/۵۵	۴۹/۷۲	۴۹/۹۷

* به دلیل نزدیکی منحنی این اسیدهای آمینه در جیره های غذایی مجموع آنها محاسبه شده است.

جدول ۲-۳: دستگاه‌های مورد استفاده در آزمایشات آنالیز جیره غذایی

دستگاه مورد استفاده	ترکیب شیمیایی
آون مدل Shimifan LO.141	رطوبت
کوره مدل Shimifan F.47	خاکستر
دستگاه کج‌دال مدل Bakhshi V40	پروتئین
دستگاه سوکسله ساخت شرکت Bakhshi	چربی

۲-۶- ماهیان مورد آزمایش

ماهیان مولد نر قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد استفاده در این پژوهش از گله مولدین موجود در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی (شهید مطهری یاسوج) انتخاب شده و تلاش گردید از ماهیان با وزن مشابه و هم‌سن استفاده شود. ماهیان مورد استفاده سه ساله بوده و وزن آنها در جدول ۲-۴ درج شده است.



شکل ۲-۱: مولدین قزل‌آلای مورد استفاده در تحقیق

جدول ۲-۴: میانگین وزن مولدین نر هر تیمار بر حسب گرم (SD ± میانگین)

تیمارها	تیمار شاهد	تیمار ۰/۵٪	تیمار ۱٪	تیمار ۱/۵٪	تیمار ۲٪
وزن مولدین نر	۲۲۱۹±۱۹۹/۱۹	۲۲۳۷±۲۱۷/۵۱	۲۲۲۱±۲۱۸/۲۱	۲۱۸۵±۲۰۱/۱۸	۲۲۵۲±۲۲۱/۳۵

۷-۲- جمع آوری اسپرم

نمونه گیری اسپرم از ماهیان نر قزل آلا ی رنگین کمان در پایان دوره آزمایش در اوایل اسفند ماه سال ۹۳ در مرکز شهید مطهری یاسوج انجام گرفت. ابتدا از هر تکرار یک ماهی صید شد و به صورت جداگانه در محلول پودر گل میخک (۱۵۰ppm) بیهوش شده و در مجموع از هر کدام از ماهی های صید شده حدود ۱۵ میلی لیتر اسپرم جمع آوری شد. اسپرم های جمع آوری شده در سانتریفیوژ قرار داده شد تا مایع سمینال آنها جداسازی شود. مایع سمینال به فریزر ۸۰- منتقل شد و پس از انجماد به منظور انجام آنالیزهای مورد نظر به آزمایشگاه ویرومد رشت فرستاده شد.



شکل ۲-۲: بیهوش کردن مولدین و جمع آوری اسپرم

۸-۲- فاکتورهای مورد بررسی

نمونه های منتقل شده به آزمایشگاه ابتدا سانتریفیوژ شده و مایع رویی آنها برای انجام آزمایش های بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

لاکتات دهیدروژناز^۱ LDH

برای سنجش آنزیم لاکتات دهیدروژناز از روش DGKC براساس روش باربسون، ۱۹۷۳ و تبدیل پیرووات به لاکتات استفاده شد. این آزمایش با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) انجام شد و مقدار آنزیم در نمونه ها با دستگاه اتوآنالیزر و در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه گیری شد.

^۱ Lactate dehydrogenase

آلانیل آمینوترانسفراز ALT^۱

برای سنجش آنزیم آلانیل آمینوترانسفراز از روش IFCC براساس تبدیل آلانیل به پیرووات و در نهایت به لاکتات استفاده شد (باربسون، ۱۹۷۳). انجام این آزمایش با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) انجام شد و نمونه‌ها با دستگاه اتوآنالایزر و در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند.

آسپاراتات آمینوترانسفراز AST^۲

برای سنجش آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز از روش IFCC براساس تبدیل آسپاراتات به گلوتامات و در نهایت به مالات استفاده شد (موس و هندرسون، ۱۹۹۹). این آزمایش با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) انجام شد و نمونه‌ها با دستگاه اتوآنالایزر و در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند.

آلکالین فسفاتاز ALP^۳

برای سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز از روش DGKC براساس تبدیل نیتروفیل فسفات به فسفات استفاده شد (DGKC, 1972). این آزمایش با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) انجام شد و نمونه‌ها با دستگاه اتوآنالایزر و در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شدند.

آهن

مقدار آهن براساس روش فتومتریک با استفاده از Ferene بوسیله کیت بیوشیمیایی شرکت پارس آزمون در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (سیدل و همکاران، ۱۹۸۴).

منیزیم

این آزمایش به صورت Endpoint و به روش فتومتری با استفاده از Xylidyl Blue انجام شد (ارهاردت و پاسچن، ۱۹۹۲). در این آزمایش منیزیم با Xylidyl Blue در یک محلول قلیایی شامل GEDTA، واکنش داده و باعث تغییر رنگ محیط می‌شود. شدت رنگ کمپلکس با غلظت منیزیم نسبت مستقیم داشته و به صورت فتومتریک قابل اندازه‌گیری است. این آزمایش با کیت پارس آزمون در طول موج ۵۰۵ نانومتر انجام شد.

فسفر

فسفر بوسیله دستگاه بیوشیمی آنالایزر با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی پارس آزمون به روش فتومتریک -uv test در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این آزمایش فسفات غیرارگانیک با آمونیوم مولیبدات تشکیل کمپلکس آمونیوم فسفومولیبدات را در حضور اسیدسولفوریک می‌دهد (بورتیس و آشود، ۲۰۰۸).

¹ Alanine aminotransferase

² Aspartate aminotransferase

³ Alkaline phosphatase

کلراید

کلراید با استفاده از کیت شرکت زیست شیمی به روش Mod.Thiocyanate / Endpoint اندازه گیری شد انگ و همکاران، ۱۹۸۵). یون های کلر موجود در نمونه با مرکوریک تیوسیانات در محیط اسیدی تولید یون های تیوسیانات می کنند، که با یون های فریک تشکیل یک کمپلکس رنگی داده و شدت رنگ آن متناسب با مقدار کلر موجود در نمونه است و در طول موج ۴۹۰ - ۵۱۰ نانومتر قابل اندازه گیری است.

کلسیم

برای سنجش کلسیم از روش Cresolphthalein complexone /Endpoint استفاده شد (چاپوتیو و همکاران، ۱۹۹۳). براساس این روش یون های کلسیم در محیط قلیایی با کرزول فتالئین کمپلکسون رنگ ارغوانی ایجاد می کنند. شدت رنگ حاصله متناسب با مقدار کلسیم موجود در نمونه است که در طول موج ۵۵۰ - ۵۸۰ نانومتر قابل اندازه گیری است. این آنالیز با استفاده از کیت شرکت زیست شیمی (تهران، ایران) انجام شد.

پتاسیم

یون پتاسیم با استفاده از دستگاه الکتروود آنالایزر براساس روش ISE اندازه گیری شد (انگ و همکاران، ۱۹۸۵).

سدیم

یون سدیم با استفاده از دستگاه الکتروود آنالایزر براساس روش ISE اندازه گیری شد (انگ و همکاران، ۱۹۸۵).

کلسترول

این آزمایش براساس کالریمتری، آنزیمی CHOD - PAP با روش فتومتریک و اندازه گیری Endpoint، با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر در طول موج ۵۰۰ نانومتر و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد (آبل و همکاران، ۱۹۵۸).

اسیداوریک

این آزمایش براساس آنزیمی - کالریمتری با استفاده از روش TODS بوسیله دستگاه اتوآنالایزر در طول موج ۵۴۶ نانومتر اندازه گیری شد (فی و همکاران، ۲۰۰۶).

اوره

اوره با استفاده از روش آنزیمی براساس روش urease - GLDH استفاده از کیت های شرکت پارس آزمون در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. اوره در حضور اوره آز هیدرولیز شده و به آمونیاک و دی اکسید کربن

تبدیل می‌شود. آمونیاک تولیدشده با 2-Oxoglutarate و NADH در حضور GLDH واکنش داده و گلو تامات و NAD، تولید می‌کند (بابلوک و همکاران، ۱۹۸۸).

فروکتوز

برای اندازه‌گیری فروکتوز از روش سلوانوف استفاده شد (توماس، ۱۹۹۸).

گلوکز

برای سنجش گلوکز از روش آنزیمی، کالریمتری (GOD - PAP) توسط کیت های شرکت پارس آزمون (کرج، تهران) استفاده شد. این آزمایش بر این اساس است که آب اکسیژنه آزادشده از گلوکز در مجاورت آنزیم گلوکز اکسیداز، با فنول و ۴-آمینوآنتی پیرین، در مجاورت آنزیم پراکسیداز تشکیل کینونیمین می‌دهد. میزان کینونیمین تشکیل شده که به صورت فتومتریک قابل اندازه‌گیری است با مقدار گلوکز رابطه مستقیم دارد. این فاکتور در طول موج ۵۴۶ نانومتر قابل اندازه‌گیری است (توماس، ۱۹۹۸).

پروتئین کل

سنجش پروتئین کل با استفاده از کیت زیست شیمی (تهران، ایران) و به روش Biuret / Endpoint اندازه‌گیری شد. بیش از ۱۰۰ سال است که روش Biuret برای اندازه‌گیری پروتئین کل مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش پیوندهای پپتیدی پروتئین‌ها در شرایط قلیایی با یون‌های مس دوظرفیتی ایجاد کمپلکس آبی - ارغوانی می‌کند که در طول موج ۵۶۰ - ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. شدت رنگ حاصل متناسب با مقدار پروتئین کل موجود در نمونه می‌باشد (جانسون و همکاران، ۱۹۹۹).

pH

با دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد.

۹-۲- آنالیز آماری

هر استخر به عنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد و داده‌های آماری به صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش گردید. در این مطالعه کلیه محاسبات آماری توسط نرم افزار SPSS 17 و انجام شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد و داده‌های غیرنرمال توسط لگاریتم نرمال شدند. بعد از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یکطرفه (One way ANOVA) استفاده شد و برای مشخص شدن تفاوت بین میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

۳- نتایج

۳-۱- پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب

جدول ۳-۲: میانگین \pm خطای استاندارد مقادیر آنزیمهای مایع اسپرمی تحت تأثیر سطوح مختلف آرژنین

سطوح افزایشی آرژنین (درصد)					آنزیمها
تیما ۲٪	تیما ۱/۵٪	تیما ۱٪	تیما ۵/۰٪	تیما شاهد	
$2936/66 \pm 417/94^a$	$2733/33 \pm 192/20^a$	$3433/33 \pm 120/18^a$	$3166/66 \pm 33/33^a$	$2821/66 \pm 36/66^a$	LDH (u/l)
$80/66 \pm 5/54^b$	$75/33 \pm 6/35^b$	$129 \pm 10/44^a$	$114 \pm 16/86^a$	$100 \pm 3/6^{ab}$	ALT (u/l)
$1526/66 \pm 119/76^b$	$1410 \pm 26/45^b$	$1816/66 \pm 44/09^{ab}$	$2400 \pm 267/64^a$	$2370 \pm 295/35^a$	AST (u/l)
$13 \pm 0/57^a$	$14/66 \pm 0/88^a$	$14 \pm 1/15^a$	$14/66 \pm 1/45^a$	$12/33 \pm 0/88^a$	ALP (u/l)

حروف غیر مشابه در هر ردیف، نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها می باشد ($P < 0/05$).

جدول ۳-۲: مقادیر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب (خطای استاندارد \pm میانگین) در طول دوره آزمایش

دمای آب (°C)	قلیابیت (ppm)	سختی (ppm)	هدایت الکتریکی ($\mu\text{s}/\text{cm}^2$)	pH	آمونیاک (ppm)	اکسیژن (ppm)
$9/60 \pm 0/11$	$120 \pm 10/56$	$120 \pm 9/61$	$277 \pm 11/01$	$7/89 \pm 0/04$	$0/004 \pm 0/002$	$8/85 \pm 0/45$

۳-۲- اثر تیمارهای مختلف غذایی بر آنزیمهای مایع اسپرمی

نتایج حاصل از اثر تغذیه مولدین با تیمارهای غذایی مختلف بر آنزیمهای مایع اسپرمی شامل (لاکتات دهیدروژناز LDH، آلانین آمینوترانسفراز ALT، آسپاراتات آمینوترانسفراز AST و آلکالین فسفاتاز ALP) در جدول ۳-۲ ارائه گردیده است. با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۳-۲ اختلاف معنی داری در میزان آنزیم LDH و ALP در بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. با این حال بیشترین میزان آنزیم LDH ($3433/33 \pm 120/18$) مربوط به تیمار ۱٪ و کمترین میزان آن ($2733/33 \pm 192/20$) مربوط به تیمار ۱/۵٪ بود. میزان آنزیم ALP در مایع اسپرمی در تیمارهای تغذیه شده با آرژنین نسبت به تیمار شاهد افزایش نسبی پیدا کرد اما این افزایش معنی داری نبود. در مقابل میزان

آنزیمهای ALT و AST در مایع اسپرمی تیمارهای مختلف با توجه به دادههای گزارش شده در جدول ۳-۲ اختلاف آماری معنی داری را نشان داده اند ($p < 0/05$). بیشترین میزان آنزیم ALT در تیمارهای ۱/۵٪ و ۱٪ مشاهده شد که با تیمار شاهد اختلاف معنی داری نشان نداد، اما با تیمار ۱/۵٪ و ۲٪ دارای اختلاف معنی دار بود. بیشترین میزان آنزیم AST ($2400 \pm 276/64$) مربوط به تیمار ۱/۵٪ بود که با تیمار شاهد و تیمار ۱٪ اختلاف معنی داری نداشت و همچنین کمترین میزان آن مربوط به تیمار ۱/۵٪ بود که با تیمار ۱٪ و ۲٪ اختلاف معنی داری نداشت.

براساس نتایج حاصل با افزایش میزان آرژنین بیش از ۰/۵٪ میزان آنزیم‌های ALT و AST مایع اسپرمی کاهش یافت.

۳-۳ اثر تیمارهای مختلف غذایی بر ترکیبات غیرآلی (یون‌ها) مایع اسپرمی

نتایج حاصل از اثر تغذیه مولدین با تیمارهای مختلف غذایی بر ترکیبات غیرآلی (یون‌ها) مایع اسپرمی در جدول شماره ۳-۳ گزارش شده است.

بصورت نمودار ارائه شود. ج: ارائه داده‌ها بصورت جدول در مورد زیر بهتر است. بعنوان مثال میزان کلسیم حدود ۴ است منیزیم حدود ۳ اما سدیم ۹۱ و آهن ۱۶۲... این اختلاف سبب درج یک نمودار بسیار ناهمگون میشود. اگر هدف مقایسه فقط یک آیتم باشد و داده‌ها در یک دامنه مثلاً ۴-۱۰ میتوان از نمودار استفاده کرد اما داده‌های زیر با دامنه ۳-۱۶۰ بهتر است در جدول درج شود.

جدول ۳-۳: میانگین ± خطای استاندارد ترکیبات غیرآلی مایع اسپرمی تحت تأثیر سطوح مختلف آرژنین

سطوح افزایشی آرژنین (درصد)					یون‌ها
تیمار ۲٪	تیمار ۱/۵٪	تیمار ۱٪	تیمار ۰/۵٪	تیمار شاهد	
۱۴۲±۱۶/۱۶	۱۲۱±۱۳/۵۷	۱۳۵±۵/۷۷	۱۵۶±۱۹/۸۵	۱۶۲±۱۱/۵۳	آهن (µg/dl)
۳/۱±۰/۱۵ ^b	۴±۰/۱۱ ^a	۳/۴±۰/۱۰ ^{ab}	۳/۴±۰/۲۵ ^{ab}	۳/۱±۰/۲۵ ^b	منیزیم (mg/dl)
۱۴±۱/۱۵	۱۲/۶۶±۱/۲۰	۱۱/۸±۰/۳۰	۱۲/۱۰±۱/۴۶	۱۲/۰۶±۰/۴۶	فسفر (mg/dl)
۹۰±۲/۸۸ ^b	۹۹/۶۶±۴/۹۱ ^{ab}	۱۰۷/۶۶±۱/۴۵ ^a	۱۰۷/۶۶±۵/۰۴ ^a	۸۵/۳۳±۶/۹۳ ^b	کلراید (mmol/l)
۴/۵۳±۰/۲۴ ^b	۵/۸۰±۰/۳۰ ^a	۴/۶۶±۰/۱۴ ^b	۴/۲۰±۰/۰۵ ^b	۴/۵۶±۰/۳۲ ^b	کلسیم (mg/dl)
۷۲±۲/۵۱ ^{bc}	۸۵/۳۳±۷/۷۵ ^{ab}	۹۱±۰/۵۷ ^a	۸۹/۳۳±۴/۲۵ ^a	۵۸/۶۶±۴/۶۳ ^c	سدیم (mmol/l)
۲۶±۰/۵۷ ^b	۲۷±۲/۰۸ ^b	۲۸/۳۳±۰/۳۳ ^b	۳۳±۱/۵۲ ^a	۲۴±۱/۵۲ ^b	پتاسیم (mmol/l)
۲/۷۶±۰/۰۴ ^b	۳/۱۵±۰/۱۱ ^a	۳/۲۰±۰/۰۴ ^a	۲/۷۱±۰/۱۷ ^b	۲/۴۳±۰/۰۷ ^b	نسبت سدیم به پتاسیم

حروف غیر مشابه در هر ردیف، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($P < 0/05$).

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۳-۳ یون‌های آهن و فسفر تحت تأثیر سطوح مختلف آرژنین جیره قرار نگرفته و اختلاف آماری معنی‌داری در این دو پارامتر بین هیچ یک از تیمارها مشاهده نشد. با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۳-۳، منیزیم اختلاف معنی‌داری را در بین تیمارهای مختلف نشان داد. براین اساس بیشترین میزان منیزیم مایع اسپرمی ($4 \pm 0/11$ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) به تیمار ۱/۵٪ مربوط بوده که با تیمارهای ۰/۵٪ و ۱٪ اختلاف معنی‌داری نشان نداد و کمترین آن مربوط به تیمار شاهد و تیمار ۲٪ بود. مقایسه میانگین مقادیر کلراید در بین تیمارهای مختلف نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار مقادیر کلراید در تیمارهای ۰/۵٪ و ۱٪ نسبت به تیمارهای شاهد و ۲٪ بود. در عین حال این پارامتر در تیمار ۱/۵٪ با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان نداد. مقایسه میانگین مقادیر کلسیم در تیمارهای مختلف نشان داد که تیمار ۱/۵٪ با مقدار $5/80 \pm 0/30$ میلی‌گرم بر

دسی لیتر) به طور معنی داری از سایر تیمارها بیشتر بود ($P < 0/05$). در سایر تیمارها اختلاف معنی داری مشاهده نشد. میانگین مقدار سدیم گزارش شده در جدول ۳-۴ برای تیمار ۱٪ ($91 \pm 0/57$) میلی مول بر لیتر) به طور معنی داری بالاتر از سایر تیمارها بود که با تیمارهای ۰/۵٪ و ۱/۵٪ اختلاف معنی داری نشان نداد. درحالیکه تیمار شاهد ($58/66 \pm 4/63$) به طور معنی داری از سایر تیمارها پایین تر بود. مقایسه میانگین مقادیر پتاسیم در تیمارهای مختلف نشان دهنده بالاتر بودن میزان پتاسیم در تیمار ۰/۵٪ ($33 \pm 1/52$) نسبت به سایر تیمارها بود و در بین سایر تیمارها اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

۳-۴- اثر تیمارهای مختلف غذایی بر ترکیبات آلی مایع اسپرمی

نتایج حاصل از اثر تغذیه مولدین با تیمارهای مختلف غذایی بر ترکیبات آلی مایع اسپرمی در جدول ۳-۴ گزارش شده است.

بصورت نمودار ارائه شود. ج: ارائه داده ها بصورت جدول در مورد زیر بهتر است. بعنوان مثال میزان کلسیم حدود ۴ است منبزم حدود ۳ اما سدیم ۹۱ و آهن ۱۶۲... این اختلاف سبب درج یک نمودار بسیار ناهمگون میشود... اگر هدف مقایسه فقط یک آیتم باشد و داده ها در یک دامنه مثلا ۴-۱۰ میتوان از نمودار استفاده کرد اما داده های زیر با دامنه ۳-۱۶۰ بهتر است در جدول درج شود

جدول ۳-۴: میانگین \pm خطای استاندارد ترکیبات آلی مایع اسپرمی تحت تأثیر سطوح مختلف آرژنین

سطوح افزایشی آرژنین (درصد)					ترکیبات آلی
تیمار ۲٪	تیمار ۱/۵٪	تیمار ۱٪	تیمار ۰/۵٪	تیمار شاهد	
$31/33 \pm 2/33^a$	$22/66 \pm 1/85^b$	$17/66 \pm 0/88^{bc}$	$16/33 \pm 1/20^c$	$28/66 \pm 1/45^a$	کلسترول (mg/dl)
$1/83 \pm 0/20^a$	$1/16 \pm 0/24^{bc}$	$1/10 \pm 0/05^{bc}$	$1/50 \pm 0/11^{ab}$	$0/93 \pm 0/03^c$	اسیداوریک (mg/dl)
$6/33 \pm 0/88^b$	$8 \pm 0/57^{ab}$	$7/33 \pm 0/33^{ab}$	$7/33 \pm 0/88^{ab}$	$10 \pm 1/50^a$	اوره (mg/dl)
$27/33 \pm 0/88^c$	$29/66 \pm 0/88^{bc}$	$27 \pm 0/57^c$	$36/33 \pm 2/02^a$	$32/33 \pm 1/20^b$	فروکتوز (mg/dl)
$3/66 \pm 0/33^c$	$5/66 \pm 0/88^{bc}$	$5/66 \pm 0/33^{bc}$	$7/66 \pm 0/88^b$	$13/33 \pm 1/45^a$	گلوکز (mg/dl)
$30/4/33 \pm 3/48^b$	$268 \pm 10/59^c$	$355/33 \pm 11/89^a$	$314/33 \pm 12/99^b$	$336 \pm 12/42^{ab}$	پروتئین کل (mg/dl)

حروف غیر مشابه در هر ردیف، نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها می باشد ($P < 0/05$).

با توجه به نتایج گزارش شده در جدول ۳-۴ میانگین مقادیر تمام ترکیبات آلی مایع اسپرمی اختلاف آماری معنی دار بین تیمارهای آزمایشی نشان داد ($p < 0/05$). براین اساس بیشترین مقدار کلسترول در تیمار ۲٪ ($31/33 \pm 2/33$) و کمترین مقدار آن در تیمار ۰/۵٪ ($16/33 \pm 1/20$) مشاهده گردید. میانگین مقادیر اسیداوریک گزارش شده نیز نشان دهنده بالاتر بودن میزان اسیداوریک در تیمار ۲٪ ($1/83 \pm 0/20$) نسبت به سایر تیمارها بود. کمترین این میزان ($0/93 \pm 0/03$) به تیمار شاهد مربوط بود که با تیمارهای ۱٪ و ۱/۵٪ اختلاف معنی داری نشان

نداد. بر همین اساس بیشترین مقدار اوره ($10 \pm 1/50$) به تیمار شاهد و کمترین مقدار آن ($6/33 \pm 0/88$) به تیمار ۲٪ مربوط بود. میانگین مقادیر فروکتوز گزارش شده در جدول ۳-۴ نشان دهنده بالاتر بودن میزان فروکتوز در تیمار ۰/۵٪ ($2/02 \pm 36/33$) نسبت به سایر تیمارها بود و کمترین این میزان به تیمار ۱٪ ($27 \pm 0/57$) مربوط بود. بر اساس میانگین مقادیر گلوکز گزارش شده در جدول ۳-۴ تیمار شاهد ($13/33 \pm 1/45$) بالاترین میزان و تیمار ۲٪ ($3/66 \pm 0/33$) پایین‌ترین میزان را نسبت به سایر تیمارها نشان دادند و در بین میانگین مقادیر سایر تیمارها اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. بر اساس میانگین مقادیر پروتئین کل گزارش شده در جدول ۳-۴ تیمار ۱٪ ($355/33 \pm 11/89$) بالاترین میزان و تیمار ۱/۵٪ ($268 \pm 10/59$) پایین‌ترین میزان را نسبت به سایر تیمارها نشان دادند و در میان سایر تیمارها اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد.

۳-۵- اثر تیمارهای مختلف غذایی بر pH مایع اسپرمی

نتایج حاصل از اثر تغذیه مولدین با تیمارهای مختلف غذایی بر pH مایع اسپرمی در جدول ۳-۵ گزارش شده است.

جدول ۳-۵: میانگین \pm خطای استاندارد میزان pH مایع اسپرمی تحت تأثیر درصدهای مختلف آرژنین

تیمار شاهد	تیمار ۰/۵٪	تیمار ۱٪	تیمار ۱/۵٪	تیمار ۲٪	
$8/50 \pm 0/05^a$	$8/46 \pm 0/11^{ab}$	$8/53 \pm 0/03^a$	$8/53 \pm 0/06^a$	$8/25 \pm 0/07^b$	pH

حروف غیر مشابه، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($P < 0/05$).

با توجه به داده‌های جدول ۳-۵ میزان pH مایع اسپرمی در بین تیمارهای مختلف تفاوت آماری معنی‌داری را نشان داد. مقادیر میانگین تیمارهای شاهد، ۰/۵٪، ۱٪ و ۱/۵٪ مشابه بوده اختلاف معنی‌داری نداشتند.

۳-۶- همبستگی بین پارامترهای مورد بررسی

همبستگی بین پارامترهای بیوشیمیایی و آنزیمی در جدول ۳-۶ درج شده است. همبستگی مثبت و معنی‌دار بین AST و فروکتوز ($r=0/541$) و گلوکز ($r=0/709$) از این جهت منطقی و قابل قبول است که گلوکز و فروکتوز هر دو به عنوان منابع تأمین کننده انرژی در تحرک اسپرم نقش دارند از سوی دیگر AST به عنوان آنزیم مؤثر در سوخت‌وساز و تولید انرژی مطرح می‌باشد. همچنین گلوکز که از قندهای اصلی مایع اسپرمی است توسط مسیر فسفوریلاسیون و مونوفسفوریلاسیون از طریق سوریتول دهیدروژناز و ردوکتاز آلدوز به فروکتوز تبدیل می‌شود و همبستگی مثبت و معنی‌دار ($r=0/558$) بین آنها را توجیه می‌کند.

چرا سایر موارد همبستگی را بررسی نموده اید؟؟؟ ج: جدول زیر گویای همبستگی سایر فاکتورها می‌باشد.

جدول ۳-۶: همبستگی بین ترکیبات بیوشیمیایی مایع اسپرمی قزل آلا و رنگین کمان

pH	پروتئین	گلو	فرو	اوره	اوریک اسید	کلستر	پتاسیم	سدیم	کلسیم	کلراید	منیزیم	فسفر	آهن	ALP	AST	ALT	LDH	LDH
																	۱	
																	۱	۰/۶۸۱ ^{***}
															۱	۰/۴۰۰	۰/۲۷۲	AST
														۱	-۰/۳۲۷	۰/۱۶۰	۰/۱۰۰	ALP
													۱	-۰/۱۵۸	۰/۴۰۰	-۰/۰۲۱	-۰/۲۵۶	آهن
												۱	-۰/۴۸۹	۰/۱۳۳	۰/۰۱۶	۰/۳۰۲	۰/۳۰۲	فسفر
											۱	۰/۳۱۳	۰/۶۳۳ ^{***}	۰/۳۹۸	۰/۰۳۶	۰/۱۲۳	۰/۱۲۳	منیزیم
										۱	۰/۳۸۵	-۰/۳۳۵	-۰/۱۴۱	۰/۴۴۰	۰/۰۶۱	۰/۳۶۸	۰/۵۲۶ ^{***}	کلراید
									۱	۰/۲۵۱	۷۵۰ ^{***}	۰/۱۲۵	-۰/۵۱۱	۰/۳۶۱	-۰/۵۰۶	-۰/۳۴۳	۰/۰۴۰	کلسیم
								۱	۰/۳۰۵	۰/۹۳۸ ^{***}	۰/۴۷۳	-۰/۰۹۹	-۰/۳۱۰	۰/۴۹۹	-۰/۱۳۳	۰/۴۶۸	۰/۴۶۸	سدیم
									۱	۰/۱۹	۰/۸۳۶ ^{***}	۰/۳۲۸	۰/۱۸۴	۰/۵۵۴ ^{***}	۰/۲۰۷	۰/۳۰۶	۰/۴۴۱	پتاسیم
						۱	۰/۷۲۸ ^{***}	۷۲۴ ^{***}	۰/۰۰۹	۰/۷۶۴ ^{***}	-۰/۲۸۳	۰/۳۰۵	۰/۰۰۰	-۰/۳۳۳	-۰/۳۱۸	۰/۵۴۱ ^{***}	۰/۵۶۰ ^{***}	کلسترول
									۱	۰/۳۶۶	۰/۰۰۹	۰/۵۷۴ ^{***}	-۰/۱۷۶	-۰/۰۸۷	-۰/۲۰۶	-۰/۱۹۰	۰/۰۵۰	اسید اوریک
				۱	-۰/۴۰۱	۰/۰۱۲	-۰/۴۱۴	۰/۵۴۸ ^{***}	۰/۰۷۷	-۰/۴۹۸	-۰/۰۷۱	۰/۰۳۳	۰/۰۶۵	-۰/۲۹۶	۰/۴۵۷	۰/۱۸۳	-۰/۰۴۱	اوره
			۱	۰/۲۳۵	۰/۱۱۳	۰/۲۱۱	۰/۳۰۵	-۰/۰۶۲	۰/۳۱۴	۰/۰۲۱	۰/۱۷۱	۰/۰۹۴	۰/۱۲۴	۰/۱۷۰	۰/۵۴۱ ^{***}	۰/۳۰۰	۰/۰۰۳	فروکتوز
		۱	۰/۵۵۸ ^{***}	۷۲۵ ^{***}	-۰/۴۹۱	۰/۰۲۲	-۰/۲۰۳	-۰/۴۳۲	۰/۲۳۴	-۰/۲۶۰	-۰/۱۳۰	-۰/۲۵۳	۰/۲۲۵	-۰/۱۹۹	۷۰۹ ^{***}	۰/۲۵۹	-۰/۱۴۶	گلوکز
	۱	۰/۲۳۱	۰/۰۶۴	۰/۰۹۰	-۰/۲۵۳	۰/۱۶۸	۰/۰۴۲	-۰/۰۵۰	۰/۴۰۰	۰/۰۸۸	-۰/۲۷۳	-۰/۰۲۵	۰/۱۹۷	-۰/۰۶۹	۰/۴۱۸	۰/۳۷ ^{***}	۰/۵۶۱ ^{***}	پروتئین ک
۱	-۰/۱۲۶	۰/۳۰۰	۰/۰۴۵	۰/۰۸۹	۰/۵۹۶ ^{***}	۰/۳۷۶	۰/۱۶۷	۰/۳۱۲	۰/۱۹۸	۰/۳۷۰	۰/۰۲۰	۰/۶۲۸ ^{***}	۰/۱۷۳	۰/۰۱۶	۰/۱۸۷	۰/۰۹۰	-۰/۱۵۴	pH

۴- بحث و نتیجه گیری

۴-۱- اثر تیمارهای مختلف غذایی بر آنزیم‌های مایع اسپرمی

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۲-۳ اختلاف معنی‌داری در میزان آنزیم LDH و ALP در بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. میزان آنزیم ALP در مایع اسپرمی در تیمارهای تغذیه شده با آرژنین نسبت به تیمار شاهد افزایش نسبی پیدا کرد اما این افزایش معنی‌داری نبود. درمقابل میزان آنزیم‌های ALT و AST در مایع اسپرمی تیمارهای مختلف با توجه به داده‌های گزارش شده در جدول ۲-۳ اختلاف آماری معنی‌داری را نشان داده‌اند ($p < 0.05$). براساس نتایج حاصل با افزایش میزان آرژنین بیش از ۰/۵٪ میزان آنزیم‌های ALT و AST مایع اسپرمی کاهش یافت.

از آنجا که در مرور منابع انجام شده، موضوعی مشابه با تحقیق حاضر (بررسی تأثیر اسیدآمین به پارامترهای بیوشیمیایی اسپرم ماهی) مشاهده نشد که بتوانیم یافته‌های خود را با آنها مطابقت داده و به همسوبودن و یا غیرهمسو بودن آنها با سایر مطالعات دست یابیم به ناچار پارامترهای اندازه‌گیری شده در تیمار شاهد خود را با یافته‌های سایر مطالعاتی که این پارامترها را در مایع اسپرمی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اندازه‌گیری و بررسی کرده بودند مقایسه کردیم. تفاوت‌های مشاهده شده در مقایسه‌ی میزان فاکتورهای اندازه‌گیری شده در این تحقیق و سایر محققین و همچنین در تحقیقات مختلف می‌تواند ناشی از عوامل متعددی باشد که ترکیبات مایع اسپرمی را در ماهی‌ها تنظیم می‌کند. این عوامل شامل (۱) مکانیسم‌های هورمونی تنظیم‌کننده اسپرمیشن طی فصل تولیدمثل، (۲) فاگوسیتوز اسپرم در بیضه‌ها در طول فرآیند دژنره‌شدن در دوره پس از تخم‌ریزی، زمانیکه اسپرم‌های باقیمانده توسط اپیتلیوم مجرای اسپرم‌بر بازجذب می‌شوند، (۳) رژیم غذایی مولدین و (۴) بسیاری از استراتژی‌های مختلف استفاده شده برای القاء تخم‌ریزی مصنوعی مانند مدت زمان و شدت بیهوشی مولدین، تناوب و زمان استحصال اسپرم و نژاد مولدین هستند.

در تحقیقات شیخی‌زاده^۱ و همکاران (۲۰۱۰) میزان آنزیم ALP اندازه‌گیری شده در مایع اسپرمی قزل‌آلای رنگین‌کمان در یک دامنه بسیار گسترده، به ترتیب (u/l) ۳۳۷ و ۱۱، میزان آنزیم AST (u/l) ۷۲۲ و ۳۳/۵۶ و میزان آنزیم LDH (u/l) ۵۷۹ و ۱۹۹/۸۷ گزارش شده است. درحالی‌که در تحقیق حاضر میزان این آنزیم‌ها در تیمار شاهد به ترتیب (u/l) ۱۲/۳۳، ۲۳۷۰ و ۲۸۲۱ اندازه‌گیری شد. در تحقیق خواجه و پیغان (۱۳۸۶) میزان ALT اندازه‌گیری شده در مایع اسپرمی قزل‌آلای رنگین‌کمان (u/l) ۲۹ گزارش شده است و در تحقیق حاضر این آنزیم (u/l) ۱۰۰ اندازه‌گیری شد. از آنجایی که میزان آنزیم‌ها تحت تأثیر دستکاری به سرعت تغییر می‌کند وجود دامنه گسترده در اعداد گزارش شده در تحقیقات مختلف طبیعی بوده و قابل قبول است. از سوی دیگر فعالیت آنزیم‌ها در مایع اسپرمی می‌تواند به عنوان یک شاخص استرس مورد استفاده قرار گیرد. لاکتات دهیدروژناز آنزیمی است که تبدیل پیرووات (محصول نهایی گلیکولیز) به لاکتات را کاتالیز می‌کند و در نتیجه

^۱ Sheikhzadeh

در طی گلیکولیز ATP تولید می کند که نیاز به آن در هنگام استرس افزایش پیدا می کند. بیشتر انرژی مورد نیاز برای تحرک اسپرم از اکسیداسیون فروکتوز در پروسه بی هوازی گلیکولیز تأمین می شود که محصول لاکتیک اسید است و در عبور آن از طریق غشای سلولی، لاکتیک دهیدروژناز نقش ایفا می کند. افزایش سطح LDH، تغییرات متابولیکی همچون کاتابولیسم گلیکوژن و تغییر گلوکز به سمت تشکیل لاکتات در ماهیان در معرض استرس را در درجه اول دریافت عضله نشان می دهد. مواجهه ماهی با استرس های زیاد در طی دوره پرورش طبیعی است در این حالت یک آنتی اکسیدان مناسب می تواند استرس های اکسیداتیو را کاهش داده و از غشای اسپرمی در برابر پراکسیداسیون چربی محافظت کند و یا حتی آزاد شدن آنزیم هایی همچون AST، ALP و LDH را به درون مایع اسپرمی کاهش دهد.

آنزیم های پلاسمایی هرچند نشانه دقیقی از عملکرد بافت ها نیستند، اما به عنوان شاخص بسیار بااهمیتی در نشان دادن ضایعات متعدد بافتی مورد استفاده قرار می گیرند. با توجه به اینکه تمامی مواد پس از وارد شدن به بدن به کبد رفته و در آنجا متابولیزه شده و متابولیت های آنها به کلیه حمل می شود لذا این دو اندام بیشترین تأثیر را از جذب مواد می گیرند. آسیب های کبدی متعاقب تأثیر مواد سمی، منجر به افزایش پلاسمایی سطح آمینوترانسفرازها می گردد. LDH یک آنزیم کبدی بوده که مسئول تبدیل کردن پرووات به لاکتات می باشد و تحت شرایط استرس زا باعث تولید لاکتات برای فرآیند گلیکوژنزیم می شود. از جمله شرایط بدپرورشی که باعث افزایش LDH در پلازما می شوند می توان به استرس، میزان کم اسیدهای چرب غیراشباع در جیره، تراکم بالا یا کمبود ویتامین E در جیره اشاره کرد.

آلکالین فسفاتاز ترشح اصلی اپیدیدیم است، اندامی که نقش حیاتی در بلوغ سلول اسپرم ایفا می کند، تعیین فعالیت این آنزیم در سیتوپلاسم سلول های اسپرم، ارتباط آنها را با متابولیسم گلیکوژن در اپیتلیوم اپیدیدیم نشان می دهد، بنابراین امکان بلوغ اسپرم دارای انرژی کافی را فراهم می کند. همچنین ALP در تولید فروکتوز آزاد مایع سمینال نقش دارد. پس از تولید فروکتوز، انرژی ضروری برای تحرک سلول اسپرم فراهم می گردد. سطوح متغیر فعالیت ALP در مایع منی انسان، گربه، گاو، خرگوش، موش، قوچ، بز، بوفالو، خروس، بوقلمون، گراز و شتر گزارش شده است (الدراجی و همکاران، ۲۰۱۳). اعتقاد بر این است که ALP در واکنش های گلیکولیتیکی و تشکیل فروکتوز درگیر است.

ویزر (۱۹۸۰) در مطالعه ای که بر روی ماهی قزل آلا انجام داد، بیان نمود که مقدار ALT و AST سرم در زمان تخمیزی ماهی افزایش می یابد. AST و همچنین LDH به عنوان آنزیم هایی که از سلول های آسیب دیده خارج می شوند در نظر گرفته می شوند، بنابراین افزایش سطح آنها در مایع اسپرمی می تواند کاهش کیفیت مایع اسپرمی را نشان دهد.

فعالیت خارج سلولی ترانس آمینازها به دلیل نشت آنها به درون مایع اسپرمی ناشی از آسیب به اسپرم است، بنابراین ترانس آمینازهای مایع اسپرمی به عنوان شاخصی برای اندازه گیری آسیب های متحمل شده توسط اسپرم طی

شرایط مختلف ارزیابی می‌شوند. آنزیم‌های رها شده از اسپرم به طور کلی به عنوان آسیب سلولی در نظر گرفته می‌شوند، در نتیجه غشا با تغییر نفوذپذیری یا تخریب در نتیجه خروج مواد از آنها غیرفعال می‌شود. آسیب اسپرم از طریق استرس اکسیداتیوی منجر به نفوذپذیری غشا نسبت به آنزیم‌ها و سایر مواد می‌شود، و بنابراین، فعالیت متابولیکی اسپرم کاهش می‌یابد.

در مجموع، تغییرات مشاهده شده در میانگین مقادیر آنزیم‌های مایع اسپرمی نشان داد که سطوح ۰/۵٪ و ۱٪ آرژنین میزان این آنزیم‌ها را نسبت به تیمار شاهد افزایش داده که نشان دهنده کاهش کیفیت اسپرم می‌باشد در حالیکه تیمار ۱/۵٪ و ۲٪ آرژنین میزان آنها را نسبت به تیمار شاهد کاهش داده است. بنابراین از آنجا که در مجموع با توجه به نتایج مطالعات مشابه کاهش این آنزیم‌ها در مایع اسپرمی نشان دهنده کیفیت بهتر مایع اسپرمی و عملکرد فیزیولوژیک خوب آن خواهد بود، تیمار ۱/۵٪ با مقدار کمتر آرژنین و اثر بیشتر در کاهش مقدار این آنزیم‌ها در مایع اسپرمی نسبت به تیمار ۲٪ به عنوان بهترین تیمار قابل توصیه است.

نتایج مطالعه حاضر بیشترین تأثیر آرژنین بر پارامترهای بیوشیمائی مایع منی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را در تیمار ۱/۵٪ نشان داد. آنزیم‌های AST و ALT در مایع اسپرمی ماهیان تغذیه شده با تیمار ۱/۵٪ آرژنین کاهش یافت. این امر می‌تواند به نقش آنتی‌اکسیدانی آرژنین و ممانعت آن از پراکسیداسیون غشا فسفولیپیدی تحت شرایط مختلف پراکسیداسیون از طریق مکانیسم تولید نیتریک اکساید اشاره کند. این مکانیزم از تمامیت ساختار و عملکرد اسپرم‌ها محافظت کرده و با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، منجر به کاهش اسپرم‌های غیرطبیعی در طول ذخیره‌سازی شده و بقا و سلامتی اسپرم را طولانی می‌کند. این سطح از آرژنین همچنین باعث افزایش یون‌های کلسیم و منیزیم در این تیمار شده که برای شروع تحرک و افزایش مدت زمان فعالیت اسپرم ضروری است. علاوه بر این حداکثر نسبت سدیم به پتاسیم در همین تیمار مشاهده شد که می‌تواند بر نرخ باروری اسپرم تأثیرگذار باشد. در کل یون‌های کلر، سدیم و پتاسیم در تیمارهای حاوی آرژنین نسبت به تیمار شاهد افزایش یافته‌اند اما با افزایش سطح آرژنین در جیره غذایی از میزان این یون‌ها کاسته شده است. با افزایش میزان آرژنین در جیره‌های غذایی، کاهش خطی در مقدار گلوکز مشاهده شد که می‌تواند نشان دهنده نقش آرژنین در مصرف گلوکز در چرخه کربس باشد، در مقابل میزان ATP افزایش پیدا کرده و انرژی لازم برای تحرک اسپرم بهتر فراهم می‌گردد. از سوی دیگر تغییر در میزان آرژنین جیره غذایی بر میزان آنزیم‌های LDH و ALP و همچنین یون‌های آهن و فسفر اثر معنی‌داری نداشت.

۲-۴- اثر تیمارهای مختلف غذایی بر ترکیبات غیر آلی (یون‌ها) مایع اسپرمی

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۳-۳ یون‌های آهن و فسفر تحت تأثیر سطوح مختلف آرژنین جیره قرار نگرفته و اختلاف آماری معنی‌داری در این دو پارامتر بین هیچ یک از تیمارها مشاهده نشد. کلیه رفرنس‌ها در انتهای متن وجود دارند.

در تحقیقات متعدد انجام شده درخصوص ترکیبات غیرآلی مایع اسپرمی ماهی قزل آلا رنگین کمان پتاسیم، سدیم، کلسیم (گلوگوسکی^۱ و همکاران، ۲۰۰۰؛ سکر^۲ و همکاران، ۲۰۰۴؛ خواجه و پیغان، ۱۳۸۶؛ شیخزاده و همکاران، ۲۰۱۰)، منیزیم (سکر و همکاران، ۲۰۰۴)، فسفر (گلوگوسکی و همکاران، ۲۰۰۰ و خواجه و پیغان، ۱۳۸۶) و کلراید (سکر و همکاران، ۲۰۰۴ و خواجه و پیغان، ۱۳۸۶) نتایج مختلفی ارائه شده است که این اختلافات میتواند به دلیل شرایط آزمایش، نحوه اسپرم گیری، اندازه ماهی، جیره های غذایی و شرایط پرورش باشد.

مطالعات انجام شده درخصوص ترکیبات غیرآلی مایع اسپرمی ماهی های مختلف نیز نشان دهنده دامنه گسترده مقادیر این ترکیبات می باشد که تحت تأثیر عوامل گوناگون قرار داشته است. به طور کلی تشکیل مایع اسپرمی (شامل ترکیبات معدنی و آلی) یک پروسه ترشحی فعال از اپیتلیوم مجرای اسپرم بر است. سطوح پایین اسمولالیت^۳ و سدیم و پتاسیم می تواند ناشی از کاهش فعالیت ترشحی مجرای اسپرم بر باشد. گفته می شود با افزایش بیش از حد یون سدیم که یکی از یون های غالب در مایع اسپرمی است طول دوره تحرک و همچنین درصد اسپرماتوزوای متحرک کاهش می یابد. در مطالعات مشابه اشکلنک و کاهمن برای اولین بار رابطه عدم تحرک اسپرم قزل آلا را با غلظت بالای یون های پتاسیم در مایع اسپرمی ثابت کردند. از سوی دیگر ارتباطات بین اثر یون پتاسیم و غلظت یون های سدیم، کلسیم و هیدروژن بر قابلیت تحرک اسپرم شناخته شده و توسط سایر محققین تأیید شده است. همچنین شناخته شده است که یون سدیم و تا حد قوی تری یون کلسیم بر اثر مهارکنندگی یون پتاسیم غلبه می کنند. به طور کلی گفته می شود در آزادماهیان تحرک اسپرم بوسیله غلظت یون پتاسیم کنترل می شود. همچنین مشخص شده است که غلظت زیاد یون پتاسیم تحرک اسپرم در آزادماهیان را مهار می کند، درحالی که باعث افزایش تحرک اسپرم در کپور می شود. در گزارش سوزوکی و موريساوا (۱۹۸۳) بیان شد که یون پتاسیم عامل مناسبی برای بازدارندگی حرکت اسپرم در مایع اسپرمی است. موريساوا (۱۹۸۳) بیان کرد غلظت پتاسیمی که جهت جلوگیری از تحرک اسپرم مورد نیاز است بستگی به غلظت یون سدیم دارد، اگر غلظت یون سدیم بالا باشد میزان پتاسیم بیشتری برای جلوگیری از تحرک اسپرم لازم است. شورینگ^۴ (۱۹۲۵) (دلیل ارائه رفرنس قدیمی نبود و یا نایاب بودن اطلاعات در این خصوص میباشد) گزارش داد که یون های مانند سدیم، کلسیم و منیزیم اثر بازدارندگی یون پتاسیم را خنثی کرده و کاتیون های دوظرفیتی نسبت به سدیم بسیار موثرترند. هونگ و ایدلر (۱۹۶۹) رابطه ای بین نسبت سدیم به پتاسیم در مایع اسپرمی و نرخ باروری اسپرم در ماهی آزاد اطلس را دریافتند، و آست (۱۹۹۱) رابطه مثبتی بین نرخ باروری و سطح اسمولالیت، سدیم و پتاسیم مایع اسپرمی را نشان داد. در مایع اسپرمی قزل آلا رنگین کمان کلسیم اضافی اسپرم باعث

¹ Glogowski

² Secer

^۳ اسمولالیت غلظت املاح در ۱۰۰۰ گرم آب را بیان می کند.

⁴ Scheuring

تحریک فعالیت آدنیلات سیکلاز می‌شود و پس از آن آدنوزین مونوفسفات حلقوی درون سلول‌ها را افزایش می‌دهد که شروع حرکات تاژک را تنظیم می‌کند. کاتیون‌ها (اغلب کاتیون‌های دو ظرفیتی مانند کلسیم) اثر آنتاگونیستی برای جلوگیری از تأثیر یون پتاسیم بر تحرک اسپرم دارند. مطالعات متعددی نقش یون کلسیم حتی در حد میلی‌مولار را در افزایش پارامترهای حرکتی اسپرم، که شامل کل دوره تحرک، درصد اسپرم‌های متحرک و سرعت حرکت اسپرم می‌باشد را نشان دادند. به همین دلیل محتوای کلسیم مایع اسپرمی ارتباط معنی‌داری با ظرفیت لقاح مایع اسپرمی دارد.

یکی دیگر از پارامترهایی که بر تحرک اسپرم موثر است، یون منیزیم می‌باشد. کوسون (۱۹۹۹) بیان نمود که یون منیزیم یون کلیدی در شروع فعالیت اسپرم ماهیان استخوانی است. اطلاعات کمی درباره اثر یون منیزیم بر روی حرکت اسپرم وجود دارد. تحقیقات صورت پذیرفته بر روی مکانیزم‌های داخل سلولی حرکت اسپرم در ماهیان استخوانی بازگوکننده نقش مهم و کلیدی یون منیزیم در شروع فعالیت حرکت اسپرم ماهیان استخوانی است. غلظت متغیر میزان یون‌های کلراید و کلسیم می‌تواند به ترشح مایع اسپرمی از اپیتلیوم مجرای اسپرم‌بر و همچنین سایر فاکتورها مانند زمان تخم‌ریزی گونه ماهی و آلودگی به ادرار در زمان اسپرم‌کشی مرتبط باشد. به احتمال زیاد یون‌های سدیم و کلراید الکترولیت‌های عمده‌ای در مایع اسپرمی هستند که نقش مهمی در حفظ اسمولالیت مایع اسپرمی و بقای اسپرم در شرایط داخل بدن قبل از اینکه در محیط طبیعی رها شوند ایفا می‌کنند و طی فعالیت تخم‌ریزی باعث حفظ تحرک آنها می‌شوند.

در مجموع با توجه به نتایج حاصل در این تحقیق بخصوص افزایش میزان کاتیون‌های منیزیم و کلسیم در تیمار ۱/۵٪ که نقش مؤثری در مهار اثر بازدارندگی پتاسیم داشته که این عامل نقش مؤثری بر شروع تحرک، مدت زمان تحرک، سرعت حرکت و درصد اسپرم‌های متحرک دارد رهنما (۲۰۱۰). لذا می‌توان این سطح از آرژنین را در جیره غذایی ماهیان مولد قزل‌آلا مؤثر بر کیفیت اسپرم و در نتیجه بهبود راندمان تکثیر دانست.

۳-۴- اثر تیمارهای مختلف غذایی بر ترکیبات آلی مایع اسپرمی

با توجه به نتایج گزارش شده در جدول ۴-۳ میانگین مقادیر تمام ترکیبات آلی مایع اسپرمی اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی نشان داد ($p < 0.05$).

مطالعات انجام‌شده در خصوص ترکیبات آلی مایع اسپرمی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توسط محققین مختلف از جمله لویر^۱ و همکاران، ۱۹۹۰؛ سیرزسکو و دابروسکی، ۱۹۹۳؛ لانستینر و همکاران، ۱۹۹۸؛ سکر و همکاران، ۲۰۰۴؛ شیخی‌زاده و همکاران، ۲۰۱۰ انجام شده که نتایج حاصل از دامنه وسیعی برخوردار بوده و نه تنها با نتایج تحقیق حاضر بلکه با یکدیگر نیز هیچ تشابهی نداشته است. دلیل این عدم تشابهات را می‌توان هم ناشی از شرایط آزمایش، اهداف تحقیقات، روش‌های سنجش پارامترها، تفاوت در اندازه ماهیان، شرایط

¹ Loir

پرورش و تغذیه و ... دانست و هم می توان آنها را تحت تأثیر استرس هایی که ماهی در زمان دستکاری برای اسپرم گیری تحمل می کند و می تواند باعث تغییر در ترکیبات فوق شود دانست. داور محترم عنایت فرمایند که در بحث معمولاً ادله مطمئن و محتمل بیان میشود. لذا این یک احتمال است...

بطور کلی اطلاعات زیادی درخصوص نقش کلسترول در مایع اسپرمی ماهیان آب شیرین وجود ندارد. اما نقش حفاظتی چربی ها و کلسترول در برابر تغییرات شرایط محیط زیست (بوئزه درجه حرارت) زمانیکه مایع منی ماهی رها می شود به اثبات رسیده است. یافته های پیرنون (۱۹۹۴) نشان داد که چربی مایع اسپرمی با متابولیسم اسپرم مرتبط است. همچنین برخی از ترکیبات آلی مانند تری گلیسیریدها و گلوکز نقش عمده ای را به عنوان منابع تأمین انرژی برای متابولیسم انرژی اسپرم ایفا می کنند، بنابراین کاهش نرخ تحرک و ظرفیت لقاح در وضعیتی با سطوح پایین تری گلیسیرید و گلوکز، اتفاق خواهد افتاد. از سوی دیگر اسپرم ماهی قادر به استفاده از کربوهیدرات های خارج سلولی است. گلوکز به عنوان قند اصلی در مایع اسپرمی شناخته شده است، لیکن اهمیت گلوکز در مایع منی ماهی مشخص نیست. از طرف دیگر، حضور این کربوهیدرات در مایع اسپرمی با تقاضای بالای انرژی برای بیضه ها طی اسپرماتوزن یا برای سنتز چربی اسپرماتوزوا در ارتباط است. سکر (۲۰۰۴) همبستگی معنی داری بین گلوکز و طول دوره تحرک اسپرم در قزل آلا ی رنگین کمان گزارش نمود. همانگونه که مشاهده شد (جدول ۳-۴) همزمان با افزایش آرژنین در جیره های غذایی میزان گلوکز کاهش یافته است که می تواند نشان دهنده کاهش ذخیره انرژی در مایع منی ماهیان تحت آزمایش باشد. این کاهش به دلیل نقش آرژنین در بهبود بخشیدن میزان گلیکولیز است که باعث مصرف گلوکز در چرخه کربس و افزایش نرخ آدنوزین تری فسفات و تولید لاکتات در اسپرم می باشد و بدین وسیله آرژنین امکان دسترسی به انرژی را برای اسپرم فراهم کرده و در نتیجه تحرک اسپرم را ترقی می دهد. بر همین اساس با افزایش درصد آرژنین در تیمارهای غذایی کاهش خطی و معنی دار گلوکز در مایع اسپرمی مشاهده شد. به طور کلی میزان فروکتوز نیز در تیمارهای حاوی آرژنین نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان داد.

نقش خاص پروتئین در اسپرم ماهی هنوز به طور کامل شناخته نشده است. گفته می شود پروتئین کل بوسیله کاهش نرخ پراکسیداسیون چربی نقش محافظتی در مایع اسپرمی داشته و می تواند طول عمر اسپرم های انکوباتور شده را تنظیم کند. همچنین لی (۲۰۰۸) گزارش داد که پروتئین های اسپرم در مایع اسپرمی و اسپرماتوزوای ماهیان استخوانی و غضروفی برای سازگاری در محیط آبی تکامل یافته اند. رابطه مثبت پروتئین با منیزیم و کلسترول می تواند برای تأثیر بر تحرک اسپرم قابل توجه باشد. لانستیر (۲۰۰۴) دریافت که پروتئین های مایع اسپرمی بقای اسپرم قزل آلا ی رنگین کمان را طولانی می کند به طوریکه می توان تحرک اسپرم را در زمان طولانی تری اندازه گیری کرد. بوزکارت (۲۰۰۶) نشان داد که مقدار پروتئین بالا ($9/42 \pm 3$ گرم در دسی لیتر) برای مایع اسپرمی قزل آلا ی قهوه ای ضروری است. در مطالعه سکر و همکاران (۲۰۰۴) غلظت پایین پروتئین نشان دهنده تقاضای پایینی برای پروتئین در پایان فصل تخم ریزی تلقی شده است. همبستگی مثبت بین سطح

پروتئین و یون‌های پتاسیم و کلسیم می‌تواند تأثیر بر تحرک اسپرم را توجیه کند. غلظت قابل توجهی از میزان اوره در مایع اسپرمی یافت شد. اعتقاد بر این است که میزان اوره با متابولیسم پروتئین و پروتئین کل در ارتباط است، زیرا در نتیجه هضم پروتئین که حاوی ازت می‌باشد تشکیل می‌شود. مقادیر کم اوره نشان می‌دهد که آلودگی کمی وجود دارد. اسیداوریک یکی از آنتی‌اکسیدان‌های اصلی محلول در آب در پلاسمای خون انسان و ماهی است. غلظت بالای اسید اوریک در مایع اسپرمی انسان به محافظت از اسپرم در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن مرتبط است. از آنجا که اسیداوریک یکی از آنتی‌اکسیدان‌های رایج در مایع منی پستانداران است سیرزکو و همکاران (۱۹۹۹) ثابت کردند که این ترکیب در مایع اسپرمی ماهی نیز وجود دارد. رابطه بین سطح اسیداوریک در مایع اسپرمی و پلاسمای خون به منظور مقایسه پتانسیل آنتی‌اکسیدانی این مایعات مورد بررسی قرار گرفت. سرانجام غلظت اورات در مایع اسپرمی و ادرار اندازه‌گیری شد، چنانچه آلودگی ادرار مایع منی می‌تواند به طور جدی بر غلظت اورات در مایع منی تأثیرگذار باشد.

۴-۴- اثر تیمارهای مختلف غذایی بر pH مایع اسپرمی

با توجه به داده‌های جدول ۳-۵ میزان pH مایع اسپرمی در بین تیمارهای مختلف تفاوت آماری معنی‌داری را نشان داد. مقادیر میانگین تیمارهای شاهد، ۱٪ و ۱/۵٪ مشابه بودند و با تیمار ۰/۵٪ اختلاف معنی‌داری نداشتند. همچنین بین تیمار ۰/۵٪ و ۲٪ نیز اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

در تحقیق سکر و همکاران (۲۰۰۴) میزان pH، ۶/۷۰ گزارش شد درحالی‌که این فاکتور در تحقیق حاضر ۸/۵۰ برآورد شد. با مطالعه ترکیبات مایع اسپرمی و اسمولاریته آن اطلاعاتی درباره مکانیسم تنظیم‌کنندگی رفتار و تحرک اسپرم را متوجه خواهیم شد. فاکتورهایی مانند pH و یون‌های موجود در مایع اسپرمی ممکن است غشای سلول را قطبی و باعث تحریک تحرک اسپرم شوند. pH یکی از پارامترهای مهم فعال‌کننده اسپرم در ماهیان مختلف است که روی قابلیت لقاح اسپرم تأثیر می‌گذارد. pH درون سلولی و برون سلولی مانند ترکیبات یونی محلول‌های فعال‌کننده روی شروع و طول دوره حرکتی اسپرم تأثیر می‌گذارد. گزارش شده‌است که pH به عنوان یکی از عوامل اصلی تحریک‌کننده حرکت اسپرم در ماهیان است. مطالعات روی برخی گونه‌های آزادماهی نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد چام^۱ نشان داده‌است که حین عبور مایع اسپرمی از لوله اسپرم‌بر، pH مایع اسپرمی تحت تأثیر ترشح یون بی‌کربنات توسط سلول‌های اپیتلیالی لوله اسپرم‌بر افزایش می‌یابد که به نظر می‌رسد این فرآیند در آزادماهیان توسط هورمون رسیدگی نهایی ۱۷آلفا-۲۰بتا-دی‌هیدروکسی-۴-پرگن-۳-وان^۲ کنترل شود. اپتیمم حرکت اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان (در درجه حرارت ۲۱-۵ درجه سانتی‌گراد) در pH ۹ حاصل می‌شود. در قزل‌آلای رنگین‌کمان pH مایع اسپرمی معمولاً ۸/۵ - ۷/۵ است. میانگین پی اچ در

^۱ Chum salmon

^۲ 17 α - 20 β dihydroxy - 4 - pregnen - 3 - one

این تحقیق با میانگین پی اچ بدست آمده توسط سکر و همکاران همخوانی نداشت. در مطالعه بر روی مایع اسپرمی تاس ماهی ایرانی بین pH اسپرم و درصد لقاح و همچنین بین pH اسپرم و نرخ تفریح رابطه مثبتی مشاهده شد. افزایش سرعت حرکت اسپرم و مدت زمان تحرک آن، افزایش میزان لقاح و نرخ تفریح متناسب با افزایش pH در ماهیان مختلفی از جمله قزل آلا، رنگین کمان، گربه ماهی افریقایی، ماهی سفید دریای خزر، سیم و ماهی قرمز گزارش شده است. همچنین مشخص گردید که کاهش pH از ۸ به ۷/۵ در اسپرم ماهی کاد اقیانوسی کاهش شدیدی در درصد تحرک و سرعت سلول اسپرماتوزوئید ایجاد کرد. در مطالعه مایع منی تاس ماهی ایرانی مشاهده شد که با افزایش pH اسپرم از ۷/۵۰ تا ۹/۰۹ میزان لقاح (از ۴۱٪ به ۹۵٪) و نرخ تفریح (از ۳۲٪ به ۸۲٪) افزایش یافت. همچنین به اثبات رسیده است که میزان آدنوزین مونوفسفات که زمینه شروع تحرک در اسپرماتوزوئید را در آزادماهیان فراهم می کند، با افزایش pH افزایش یافته و سبب افزایش باروری اسپرم می شود. در مطالعه حاضر افزایش آرژنین تنها در سطح ۲٪ توانسته است تأثیر معنی داری را بر کاهش pH مایع اسپرمی ایجاد کند و در سایر سطوح تفاوت معنی داری را در میزان pH باعث نشده است.

۴-۵- همبستگی بین پارامترهای مورد بررسی

همبستگی مثبت و معنی دار بین AST و فروکتوز ($r=0/541$) و گلوکز ($r=0/709$) از این جهت منطقی و قابل قبول است که گلوکز و فروکتوز هر دو به عنوان منابع تأمین کننده انرژی در تحرک اسپرم نقش دارند از سوی دیگر AST به عنوان آنزیم مؤثر در سوخت و ساز و تولید انرژی مطرح می باشد. همچنین گلوکز که از قندهای اصلی مایع اسپرمی است توسط مسیر فسفوریلاسیون و مونوفسفوریلاسیون از طریق سوربیتول دهیدروژناز و ردوکتاز آلدوز به فروکتوز تبدیل می شود و همبستگی مثبت و معنی دار ($r=0/558$) بین آنها را توجیه می کند. از آنجاییکه ALP نقش مهمی در تولید فروکتوز به عنوان منبع تأمین کننده انرژی برای تحرک اسپرم ایفا می کند و از سوی دیگر کاتیون های دو ظرفیتی از جمله منیزیم در مهار اثر بازدارندگی پتاسیم بر تحرک اسپرم نقش دارند، طبیعی است همبستگی مثبت و معنی داری بین ALP و کاتیون منیزیم وجود داشته باشد. سدیم به عنوان یکی از یون های تشکیل دهنده مایع اسپرمی نقش مهمی را در بقاء و قابلیت تحرک اسپرم ایفا می کند. سدیم از یکسو به همراه کلراید به عنوان مهمترین الکترولیت های مایع اسپرمی در حفظ اسمولالیت و بقاء اسپرم نقش ایفا می کند لذا همبستگی مثبت و قوی ($r=0/938$) بین این دو یون مشاهده می شود که با گزارشات سکر و همکاران (۲۰۰۴) در ماهی قزل آلا، رنگین کمان ($r=0/733$, $P<0/05$) و همچنین علوی و همکاران (۲۰۰۴) در تاس ماهی ایرانی ($r=0/584$, $p<0/05$) همخوانی داشت و از سوی دیگر حضور یون هایی مانند سدیم، کلسیم و منیزیم باعث کنترل اثر مهارکنندگی پتاسیم بر تحرک و مدت زمان حرکت اسپرم می شود، لذا در اینجا نیز یک همبستگی مثبت و قوی ($r=0/769$) بین سدیم و پتاسیم مشاهده می شود که برای حفظ کیفیت اسپرم ها و قابلیت تحرک طولانی تر آنها اهمیت دارد، این همبستگی با گزارش های بز کارت و همکاران (۲۰۰۶)

($r = 0/822$, $P < 0/01$) در ماهی آزاد اقیانوس آرام، بزکارت و همکاران (۲۰۱۱) ($r = 0/705$, $P < 0/01$) ماهی آزاد اقیانوس آرام و حلیمی و همکاران (۲۰۱۴) ($r = 0/548$, $P < 0/01$) در ماهی کلمه همخوانی داشت. کاتیون‌های دوظرفیتی نسبت به سدیم موثرتر و مطلوب‌تر هستند که در این تحقیق بین کلسیم و منیزیم همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت که با مطالعات صورت گرفته توسط، زادمجید و ایمانپور (۱۳۸۸) و همخوانی دارد. همین دلایل (حفظ اسمولالیتیه مایع اسپرمی) از یکسو و افزایش سدیم برای تأثیر بر ویژگی مهارکنندگی پتاسیم از سوی دیگر در ترکیبات یونی مایع اسپرمی بین پتاسیم و کلراید نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری ($r = 0/836$) مشاهده می‌شود.

کلسترول از مولکول‌های زیستی بوده که نقش عمده آن استحکام و انعطاف‌پذیری غشا سلول‌ها است. بنابراین با توجه به اینکه در تحقیق حاضر با افزایش درصد آرژنین میزان کلسترول نیز افزایش یافته و از طرف دیگر میزان آنزیم‌ها کاهش یافته است می‌توان نتیجه گرفت که آرژنین موجب بهبود غشای سلولی اسپرم شده و از نشت آنزیم‌ها به بیرون از سلول جلوگیری کرده است و به همین دلیل بین کلسترول و آنزیم‌های LDH و ALT همبستگی منفی مشاهده شده است. آمینوترانسفرازها در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها بخصوص در کبد نقش دارند، لذا همبستگی مثبتی بین پروتئین کل و ALT ($r = 0/837$) و همچنین LDH ($r = 0/561$) که از سایر آنزیم‌های کبدی است مشاهده می‌شود.

اسیدهای آمینه مازاد بر نیاز بدن به عنوان سوخت متابولیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در حقیقت در تجزیه اسیدهای آمینه به سوخت گروه آمین آلفا برداشته می‌شود و اسکلت باقی مانده که کربنی است به حدواسط‌های متابولیکی تبدیل می‌شود. بخش اسکلت کربنی وارد مسیر فرآیند گلوکونئوزنز شده و گلوکز تولید می‌کند و بخش آمینی آن وارد چرخه اوره شده و تولید اوره می‌کند که باعث بوجود آمدن همبستگی بین اوره و گلوکز شده است.

خروج پتاسیم از کانال پتاسیمی به دلیل رهاشدن اسپرم به محیطی است که پتاسیم کمتری نسبت به مایع اسپرمی دارد و موجب هایپرپلاریزاسیون غشای اسپرمی می‌شود که به دنبال آن آدنیل سیکلاز تحریک شده و cAMP راستتر می‌کند. سنتز cAMP باعث تحریک پروتئین کیناز می‌شود و به دنبال آن پروتئین، فسفوریله شده و تحرک اسپرم آغاز می‌شود. از سوی دیگر ALP در تنظیم فسفوریلاسیون پروتئین‌ها توسط پروتئین کیناز وابسته به cAMP برای آغاز تحرک نقش دارد (بزکارت و همکاران، ۲۰۰۹)

در تحقیق حاضر بین پتاسیم و کلسترول ($r = -0/724$, $P < 0/01$)، کلر و کلسترول و همچنین سدیم و کلسترول ($r = -0/728$, $P < 0/01$) همبستگی منفی گزارش شد که با نتایج گزارش شده توسط بزکارت و همکاران (۲۰۱۱) به ترتیب در ماهی آزاد اطلس، ماهی آزاد آرام و ماهی آزاد آرام مطابقت دارد.

پیشنهادها

۱. بررسی اثر آرژنین بر کیفیت اسپرم و عملکرد تولید مثلی
۲. بررسی اثر آرژنین بر اوولاسیون تخمک و اووژنیز
۳. بررسی اثر سایر اسید آمینه ها بر کیفیت اسپرم و تولیدمثل
۴. بررسی اثر احتمالی آرژنین بر رقابت اسپرمی و لاروهای تولیدی

منابع

- ابراهیمی، ع. و بیرقدار، ا. ۱۳۸۵. تغذیه و نیازهای غذایی ماهیان در آبی‌پروری (با تأکید بر گونه‌های قابل پرورش در ایران) (ترجمه)، انتشارات جهاد دانشگاهی واحد صنعتی اصفهان.
- حسینی، س. ش.، خارا، ح. و کلباسی، م. ر. ۱۳۸۹. تاثیر محلول‌های فعال‌کننده نمکی اسپرم بر موفقیت لقاح قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله شیلات، سال چهارم، شماره دوم، صص ۶۷-۵۷.
- حسینی، س. ش.، خارا، ح. و لرستانی، ر. ۱۳۸۸. اثر فواصل اسپرم‌گیری مولدین سنین مختلف قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بر تحرک اسپرم، اسپرماتوکریت و چشم‌زدگی تخم. مجله شیلات، سال سوم، شماره سوم، صص ۵۰-۴۱.
- سلیمی خورشیدی، ن.، کیوان شکوه، س.، سلاطی، ا. پ.، ذاکری، م.، محمودی، ن. ا. و طهماسبی کهیانی، ا. ۱۳۹۱. تأثیر سطوح مختلف نوکلئوتید جیره بر ترکیب لاشه در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) اقیانوس‌شناسی، سال سوم، شماره ۹، صص ۴۶-۴۱.
- سیر، ل.، آذری تاکامی، ق.، شهیدی، ر. و وثوقی، ع. ۱۳۸۵. ارزیابی اسپرم قزل‌آلا در مرکز تکثیر نمرود. پژوهش و سازندگی، شماره ۷۲، صص ۳۵-۳۰.
- نفیسی بهابادی، م. ۱۳۸۵. راهنمای عملی تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). انتشارات دانشگاه هرمزگان. ۲۸۲ صفحه.
- نفیسی بهابادی، م. و فلاحتی مروست، ع. ۱۳۸۷. اصول تکثیر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). انتشارات دانشگاه خلیج فارس. ۴۰۰ صفحه.
- Aas, G.H., Refestie, T. and Gjred, B. 1991. Evaluation of milt quality. *Aquaculture*, 95: 125-132.
- Abell, L., Levy, B., Brodie, B. and Kendall, F. 1958. Standard Methods in Clinical Chemistry, 2: 26-33.
- Alavi, S. M. H., Cosson, J., Karami, M., Abdolhay, H. and Mojazi Amiri, B. 2004. Chemical composition and osmolality of seminal fluid of *Acipenser persicus*; their physiological relationship with sperm motility. *Aquaculture Research*, 35: 1238-1243.
- Alavi, S. M. H., Mojazi Amiri, B., Cosson, J., Karami, M., Abdolhay, H., Pourkazemi, M. and Akhoundzadeh, M.A. 2006. Determination of semen quality of the Persian sturgeon by seminal plasma parameters and sperm motility. *Iranian Journal Fish Science*, 5(2): 1-18.
- Alavi, S. M. H., Cosson, J., Coward, K. and Rafiee, Gh. 2008. Fish spermatology. Alpha Science International, Oxford, U.K, pp398.
- Alavi, S. M. H., Psenicka, M., Rodina, M., Policar, T. and Linhart, O. 2008. Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season. *Aquatic Living Resources*, 21: 75-80.
- Al-Daraji, H. J. and Tahir, A. O. 2013. Effect of L-Carnitine supplementation on seminal plasma quality of Iraqi drakes. *Indian Journal of Applied Research*, 3: 10-14.

- AL-Ebady, A. S., Hussain, S. O., AL-Badry, K. I. and Rajab, B. A. 2012. Effect of adding arginine in different concentrations on some physical properties of poor motile bull sperms during different months. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 4(9): 130-135.
- Alejandro Buentello, J., M. Reyes-Becerril, M. De Jesu´ S Romero- Geraldo. And F. De Jesu´ s Ascensio-Valle. 2007. Effects of Dietary Arginine on Hematological Parameters and Innate Immune Function of Channel Catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 19: 195–203.
- AOAC, 1998, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 1141pp.
- Aramli, M. S., Kalbassi, M. R. and Nazari, R. M. 2013. Spermatozoa and seminal plasma enzyme activity in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, in relation to short-term storage. *Aquaculture Research*, 46(8): 2037-2042.
- Babiak, I., Glogowski, J., Luczynskj, M. J. and Luczynski, M. 1997. Effect of individual male variability on cryopreservation of northern pike, *Esox lucius* L., sperm. *Aquaculture Research*. 28: 191-197.
- Bablock, W. 1988. A General Regression Procedure for Method Transformation. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*, 26: 783-790.
- Ball, R. O., Urschel, K. L. and Pencharz, P. B. 2007. Nutritional Consequences of Interspecies Differences in Arginine and Lysine Metabolism. *The Journal of Nutrition*, 137: 1626–1641.
- Billard, R. and Cossen, M. P. 1992. Some Problems Related to the Assessment of Sperm Motility in Freshwater Fish. *the Journal of experimental zoology*, 261: 122-131.
- Bobe, J. and Labbé, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 535–548.
- Bouck, G.R. and Jacobson, J. 1976. Estimation of salmonid sperm concentration by microhematocrit technique. *Transactions of the American Fisheries Society*, 105: 534–535.
- Bozkurt, Y., OĖretmen, F., Kokcu, O. and Ercin, U. 2011. Relationships between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858) semen: with emphasis on sperm motility. *Czech Journal of Animal Science*, 8: 355–364.
- Bozkurt, Y., OĖretmen, F., Secer, F. S. and Ercin, U. 2009. Effects of Seminal Plasma Composition on Sperm Motility in Mirror Carp (*Cyprinus carpio*). *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 61: 307-314.
- Bozkurt, Y., Secer, S., Bukan, N., Akcay, E. and Tekin, N. 2006. Relationship between body condition, physiological and biochemical parameters in Brown trout (*Salmo trutta fario*) sperm. *Pakistan Journal of Biological Science*, 9: 940-944.
- Buentello, J. A., Reyes-Becerril, M., Romero-Geraldo, M. J. and Ascenico-Valle, F. J. 2007. Effects of Dietary Arginine on Hematological Parameters and Innate Immune Function of Channel Catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 19: 195–203.
- Burtis C.A. and Ashwood E.R.,(ed). 2008. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 6nd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1994:1909.
- Chapoteau, E. Czech, B. P., Zazulak, W. and Kumar, A. 1993. *Clinical chemistry*, 39(9): 1820-4.
- Ciereszko, A. and Dabrowski, K. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using spectrophotometric technique. *Aquaculture*, 109: 367–373.
- Ciereszko, A. and Dabrowski, K. 1994. Relationship between biochemical constituents of fish semen and fertility: the effect of short- term storage. *Fish Physiology and Biochemistry*. 12(5): 357-367.
- Ciereszko, A., Dabrowski, K., Kucharczyk, D., Dobosz, S., Goryczko, K. and Glogowski, J. 1999. The presence of uric acid, an antioxidant substance, in fish seminal plasma. *Fish Physiology and Biochemistry*, 21: 313–315.
- Deutsche Gesellschaft für klinische Chemie. Empfehlungen der deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKC). Standardisierung von Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten.(Recommendation of the German Society of Clinical Chemistry. Standardization of methods for measurement of enzymatic activities in biological fluids.) *Z Klin Chem Klin Biochem* 1972;10:182-92.

- Ehrhardt, V., Appel, W. and Paschen, K. 1992. Evakuierung eines Xylidyl-Blau- Reagenz zur Bestimmung von Magnesium. *Wiener klinische Wochenschrift*, 104:5-11.
- Farhat, Khan M. A. 2012. Effects of dietary arginine levels on growth, feed conversion, protein productive value and carcass composition of stinging catfish fingerling *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Aquacult International*, 20: 935–950.
- Fei, L., Yun-Sheng, Z., Li-na, Z., Jia, T., Xiao-yun, Z. and Lan, L. 2006. Evaluation of a kinetic uricase method for serum uric acid assay by predicting background absorbance of uricase reaction solution with an integrated method. *Journal of Zhejiang University Science*, 7(6): 497-502.
- Felip, A., Carrillo, M., Herráez, M. P., Zanuy, S. and Basurco, B. 2009. Protocol E: Evaluation of sperm quality. *Options Méditerranéennes*, B / no. 63: 35-39.
- Gronczewska, J., Zietara, M.S., Biegniewska, A. and Skorkowski, E.F. 2003. Enzyme activities in fish spermatozoa with focus on lactate dehydrogenase isoenzymes from herring (*Clupea harengus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134: 399–406.
- Halimi, M., Golpour, A., Dadras, H., Mohamadi, M. and Chamanara, V. 2014. Quantitive characteristics and chemical composition in Caspian Roach (*Rutilus rutilus caspicus*) sperm. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 13(1): 81-90.
- Hatef, A., Niksirat, H., Amiri, B.M., Alavi, S.M.H. and Karami, M. 2007. Sperm density, seminal plasma composition and their physiological relationship in the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Aquaculture Research*, 38: 1175-1181.
- Husein, R. H., M. O. Ahmed. And S. M. Muhammed. 2011. Effects of L-Arginine, Vitamin E and Their Combinations on Sperms Morphology in Albino Male Mice. *Journal of Al-Nahrain University*, 14: 137-143.
- Hwang, P. C. and Idler, D. R. 1969. A study of major cations, osmotic pressure, and pH in seminal components of Atlantic salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 26: 413–419.
- Ingermann, R., Holcomb, M., Robinson, M. L. and Cloud, J. G. 2002. Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Journal of Experimental Biology*, 205: 2885-2890.
- Johnson, A. M., Rohlf, E. M. and Silverman, L. M. 1999. Proteins. In: Burtis, C.A., Ashwood, E.R. (eds.). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company. pp477-540.
- Kruger, J. C., Smith, G. L. and Van Vuren, J. H. J. 1984. Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology*, 24: 263–272.
- Lahnsteiner, F. 2009. The role of free amino acids in semen of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and carp *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Biology*, 75:816–833.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. 1998. Determination of semen quality of the rainbow trout by sperm motility, seminal plasma parameters and spermatozoal metabolism. *Aquaculture*, 163: 163–181.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. and Patzner, R. A. 1996. Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. *Fish Physiology and Biochemistry*, 15: 167-179.
- Lahnsteiner, F. 2010. A comparative study on the composition and importance of free amino acids in semen of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, and perch, *Perca fluviatilis*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36: 1297–1305.
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J. and Wu, G. 2008. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids*, 37(1): 43-53.
- Lindroth, P. and Mopper, K. 1979. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with O-phthaldialdehyde. *Analytical Chemistry*, 51: 1667-1674.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H. and Nagahama, Y. 1991. The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *Journal of Experimental Zoology*, 261: 359- 363.
- Moss, D. V. and Henderson, A. R. 1999. Clinical enzymology. In: Burtis, C.A., Ashwood, E.R., (eds.). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company. pp617-721.
- Ng, R. H., Altaffer, M., Ito, R. and Statland, B. E. 1985. The technicon RA-1000 evaluated for measuring sodium, potassium, chloride and carbon dioxide. *Clinical Chemistry*, 31(3): 435-438.

- Pavlov, D., Kjqrsvik, E., Refsti, T. and Andersen, Q. 2004. Culture of Cold-Water Marine Fish. Chapter 5: Brood Stock and Egg Production.
- Perez, L., Asturiano, J. F., Mart´inez, S., Tom´as, A., Olivares, L., Moc´e, E., Lavara, R., Vicente, J. S. and Jover, M. 2003. Ionic composition and physio-chemical parameters of the European eel (*Anguilla anguilla*) seminal plasma. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28: 221–222.
- Piironen, J. 1985. Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar m. Sebago Girard*) during a spawning season. *Aquaculture*, 48: 337–350.
- Pohlenz, C., Buentello, A., Miller, T., Small, B. C., MacKenzie, D. S. and Gatlin III, D. M. 2013. Effects of dietary arginine on endocrine growth factors of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 166: 215–221.
- Rahnama, B. 2010. Supplementing a commercial diet for Atlantic Salmon (*Salmo salar*) with Arginine, Glutamate or Tetradecylthioacetic (TTA). Impact on production efficiency, slaughter parameters and flash quality, Thesis submitted for the degree of Master of Science. Department of Animal and Aquacultural Sciences Norwegian University of Life Sciences Ås, Norway.
- Rahman, M., Rahman, M. Sh., Hossain, M. and Hasan, M. 2011. Seminal plasma composition and their physiological relationship with spermatozoa motility in Silver carp *Hypophthalmichthy molitrix*. *World Journal of Fish and Marine Science*, 3(3): 194-200.
- Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F. and Nash, J. P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234: 1–28.
- Rurangwa, E., Biegiewska, A., Slominska, E., Skorkowski, E. F. and Ollevier, F. 2002. Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131: 335–344
- Roque, A., Ponte, I. and Suau, P. 2011. Secondary structure of protamine in sperm nuclei: an infrared spectroscopy study. *BMC Structural Biology*, 11(14): 1-8.
- Sadiqul Islam, M. and Akhter, T. 2011. Tale of Fish Sperm and Factors Affecting Sperm Motility: A Review. *Advances in Life Sciences*, 1(1): 11-19.
- Secer, S., Tekin, N., Bozkurt, Y., Bukan, N. and Akcay, E. 2004. Correlation between biochemical and spermatological parameters in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) SEMEN. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgah*, 56(4): 274-280.
- Shaliutina, A. 2013. Fish sperm motility parameters and total proteins profiles in seminal plasma during *in vivo* and *in vitro* storage. Vodňany, Czech Republic, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, University of South Bohemia
- Sheikhzadeh, N., Asadpour, R., Jafari Jozani, R. A. and Tayefi-Nasrabadi, H. 2010. Effect of Ergosan on semen quality of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock. *Animal Reproduction Science*, 122: 183–188.
- Siedel, J. Wahlefeld, A. W. and Ziegenhorn, J. 1984. A new iron ferro zine reagent without deproteinization. *Clinical Chemistry*, 30:975 (AACC Meeting-Abstract).
- Sukardi, S., Yaakub, H., Ganabadi, S. and Cheng, LH. 2006. Effects of L-Arginine on the Reproductive System of Male Rabbits. *Malaysian Journal Nutrition*, 12(2): 201-211.
- Taati, M. M., Mehrad, B., Shabani, A. and Golpour, A. 2010. Correlation between chemical composition of seminal plasma and sperm motility characteristics of Prussian carp (*Carassius gibelio*). *International Journal of the Bioflux Society*, 3(3): 233-238.
- Thomas, L. 1998. Clinical laboratory diagnostics. 1st edition. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft. pp65-71.
- Verma, D. K., Routray, K., Dash, C., Dasgupta, S. and 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.

Abstract

Considering the importance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in supplying required protein of people and effort to increase the efficiency of these fish reproduction, some related factors such as sperm quality and potential fertility of male are necessary. The aim of this study was to find out the effects of different dosages of Arginine on the biochemical parameters (including LDH, AST, ALT, ALP, iron, magnesium, phosphorous, chloride, calcium, sodium, Potassium, cholesterol, uric acid, urea, fructose, glucose, total protein and pH) of rainbow trout seminal plasma. For this purpose, five practical diets (each consisting of 3 triplicates) were supplemented with Arginine at 0.00 (Control), 0.50, 1.00, 1.50 and 2.00%. Broodstock feed last for 90 days. At the end of the feeding period one fish was captured from each replicate in order to collect their semen. Results indicate that there were no significant differences in LDH, ALP, Fe^{2+} and P content among different treatments. The lowest level of AST and ALT and the highest level of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions were observed in the treatment fed with 1.50% of Arginine which showed significant differences with other treatments ($p < 0.05$). Moreover, the amount of Cl^- , Na^+ and K^+ ions were significantly increased in the seminal plasma in fish which were fed on diets containing arginine in comparison to control. As the amount of Arginine were increased, the levels of uric acid stepped up significantly in contrast to the urea and glucose. The highest amounts of cholesterol, fructose and total protein were observed in the treatments fed on 2.00, 0.50 and 1.00% of Arginine, respectively, that showed significant differences with other treatments ($p < 0.05$). The highest pH value was assayed in the 1.50% of Arginine treatment. The results of the Pearson correlation coefficient showed a significant positive correlation between Ca^{2+} and Mg^{2+} ions and Na^+ with K^+ and Cl^- ions ($r=0.750$, $r=0.769$ and $r=0.938$, $p < 0.01$), respectively. On the other hand, a significant negative correlation between cholesterol with Cl^- , Na^+ , K^+ , ALT and LDH ($r=-0.764$, $r=-0.724$ and $r=-0.728$, $p < 0.01$) and ($r=-0.531$ and $r=-0.560$, $p < 0.05$) and also a significant positive correlation between K^+ and Cl^- ions ($r=0.836$, $p < 0.01$) were observed. Finally, it can be expressed that the levels of most of the ions were increased and there was a reduction in the levels of enzymes in seminal plasma of fish which were fed with practical diet including 1.5% of Arginine. So it can be recommended that adding this value of Arginine to the diets of rainbow trout broodstock, would improve the sperm quality which results in the enhancement of efficiency in rainbow trout reproduction.

Keyword: *Oncorhynchus mykiss*, Arginine, seminal plasma, Biochemical parameter

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Shahid Motahary Cold water Fishes
Genetic and breeding Research Center

Project Title : Evaluation of sperm quality and different nutrient levels on sperm efficiency in male rainbow trout

Approved Number: 2-12-12-92117

Author: Alireza Ghaedi

Project Researcher : Alireza Ghaedi

Collaborator(s) : A. Matinfar, H. Abdolhai, E. Gorjipour, E. Kazemi, M. Sharifian, H. Gandomkar, A.A. Rastiannasab, S.H. Moradyan, D. Zargham, R. Mahmudi, T. Bashti, A.H. Hosseini, M. Salahi, S. Nazari

Advisor(s):-

Supervisor: -

Location of execution : Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province

Date of Beginning : 2013

Period of execution : 2 Years & 3 Months

Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute

Date of publishing : 2016

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

**MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute - Shahid Motahary Cold water Fishes
Genetic and breeding Research Center**

**Project Title :
Evaluation of sperm quality and different nutrient levels
on sperm efficiency in male rainbow trout**

Project Researcher :

Alireza Ghaedi

Register NO.

50802