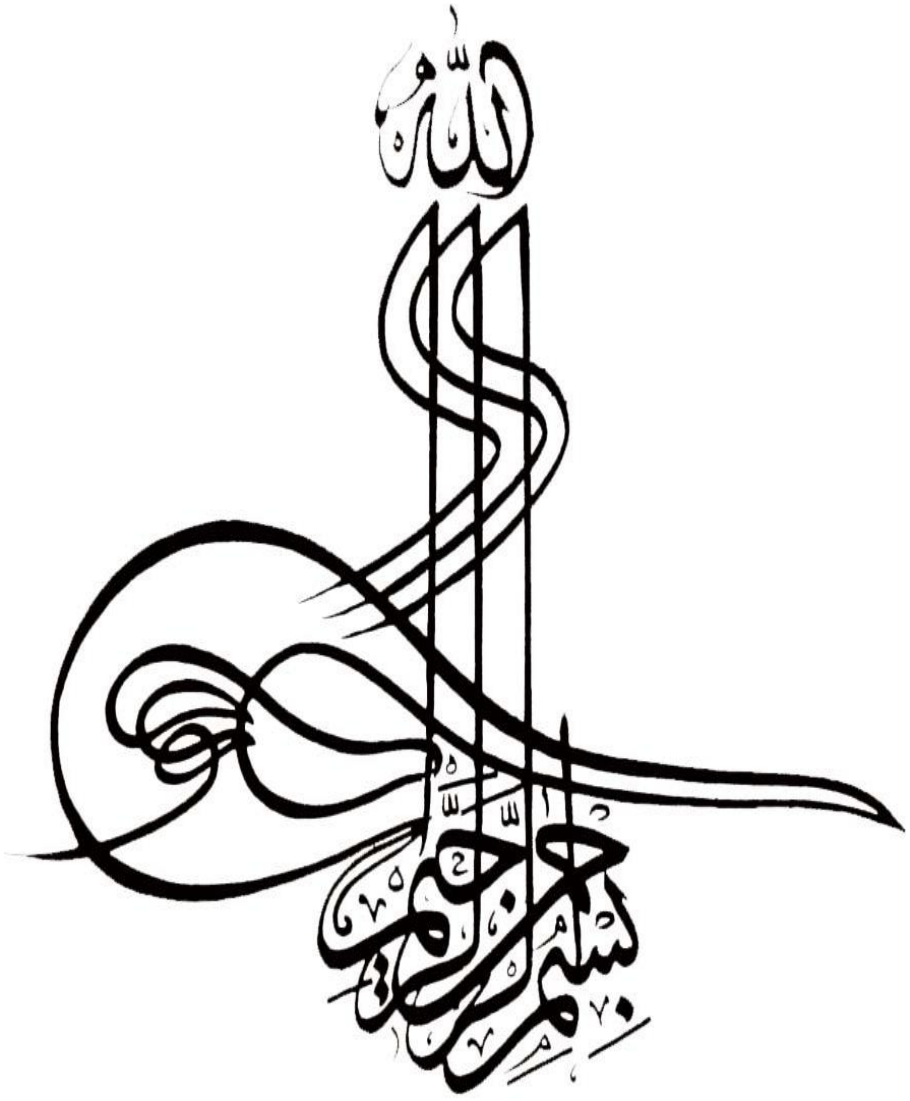
View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk

brought to you by CORE

provided by Aquatic Commons



دانشگاه آزاد اسلامی
واحد علوم و تحقیقات

رساله دکتری رشته شیلات (**Ph.D**)

موضوع:

مطالعه فیزیولوژیک و بیوشیمیایی فوق رسیدگی تخمک در ماهی آزاد پرورشی دریای خزر (***Salmo trutta caspius***) و تعیین نشانگرهای کیفیت تخمک

استادان راهنما:
دکتر عباس متین‌فر
دکتر مهدی سلطانی

استادان مشاور:
دکتر بهروز ابطحی
دکتر ایرج پوستی

نگارنده:
معصومه بحر کاظمی

سال تحصیلی: ۸۹-۱۳۸۸

سپاسگزاری

بر خود لازم می‌دانم تا از جناب آقای دکتر متین فر و جناب آقای دکتر سلطانی که راهنمایی این رساله را بر عهده داشتند تشکر نمایم. همچنین از جناب آقای دکتر ابطحی و جناب آقای دکتر پوستی که در طول انجام رساله از مشاوره ایشان بهره‌مند شدم، سپاسگزارم.

از ریاست محترم مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی شهید باهنر جهت تامین مولدین و همچنین ریاست محترم مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی به جهت مساعدت در اجرای پروژه تشکر می‌نمایم.

تقدیم به

مادر بزرگوارم

فهرست مطالب

چکیده ۱
مقدمه ۲

فصل اول: کلیـــات ۵
۱-۱- مدیریت مولدین در تکثیر مصنوعی ٦
۱-۲- ترکیب بیوشیمیایی تخمک ٦
۱-۳- مورفولوژی دیواره تخمک ۸
۱-٤- اوولاسیون و عوامل دخیل در آن ۹
۱-٤-۱- تعریف اوولاسیون ۹
۱-٤-۲- کنترل هورمونی اوولاسیون ۹
۱-٤-۳- نقش دما در ایجاد اوولاسیون ۱۰
۱-٤-٤- تشخیص ایجاد اوولاسیون ۱۱
۱-۵- کیفیت تخمک در آزادماهیان ۱۱
۱-۵-۱- فاکتورهای مؤثر بر کیفیت تخمک ۱۱
۱-۵-۲- تعیین کیفیت تخمک ۱۲
۱-٦- فوق رسیدگی در تخمک ۱۲
۱-٦-۱- زمان ایجاد پدیده‌ی فوق رسیدگی در تخمک ۱۳
۱-٦-۲- علائم ظاهری فوق رسیدگی ۱۳
۱-۷- اثرات باقی ماندن تخمک پس از اوولاسیون در محوطه ی شکمی بر رفتارهای تخم‌ریزی ۱٤
۱-۸- اثرات باقی ماندن تخمک پس از اوولاسیون در محوطه‌ی شکمی بر مورفولوژی و ترکیب بیوشیمیایی تخمک. ۱۵
۱-۹- اثرات باقی ماندن تخمک پس از اوولاسیون در محوطه‌ی شکمی بر ترکیب مایع تخمدانی ۱۸
۱-۹-۱- pH ۱۸
۱-۹-۲- اسمولالیته ۱۸
۱-۹-۳- غلظت پروتئین‌ها ۱۹
۱-۹-٤- غلظت چربی‌ها ۲۰
۱-۹-۵- فعالیت‌های آنزیمی ۲۰

فصل دوم: مرور بر منابع ۲۱

فصل سوم: مواد و روش‌ها ۲۷
۳-۱- زمان و مکان انجام پروژه ۲۸

۳-۲- شرایط فیزیکی و شیمیایی آب و حوضچه‌های نگهداری مولدین ۲۸
۳-۳- مشخصات مولدین ۲۸
۳-٤- انتخاب مولدین ۲۹
۳-۵- معاینه و تکثیر مولدین ۳۱
۳-٦- مرحله‌ی انکوباسیون ۳۲
۳-۷- اندازه‌گیری پارامترهای کیفیت تخمک ۳۲
۳-۷-۱- اندازه‌گیری درصد چشم‌زدگی ۳۲
۳-۷-۲- اندازه‌گیری درصد تفریخ ۳۳
۳-۷-۳- اندازه‌گیری درصد ناهنجاری لاروی ۳۳
۳-۸- نمونه‌برداری و تعیین متابولیت‌ها و آنزیم تخمک و مایع تخمدانی ۳۳
۳-۸-۱- اندازه‌گیری کلسیم به روش Arsenazo ۳٤
۳-۸-۲- اندازه‌گیری آهن به روش Ferrozine ۳۵
۳-۸-۳- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) به روش IFCC ۳٦
۳-۸-٤- اندازه‌گیری پروتئین کل به روش Biuret ۳٦
۳-۸-۵- اندازه‌گیری کلسترول به روش CHOD-PAP ۳۷
۳-۸-٦- اندازه‌گیری تری‌گلیسیرید به روش GPO ۳۸
۳-۸-۷- اندازه‌گیری گلوکز به روش Glucose Oxidase ۳۹
۳-۹- اندازه‌گیری pH مایع تخمدانی ٤۰
۳-۱۰- نمونه‌برداری تخمک جهت مطالعه مورفولوژی آن توسط میکروسکوپ نوری ٤۰
۳-۱۱- نمونه‌برداری تخمک جهت مطالعه توسط Scanning Electron Microscope ٤۱
۳-۱۱-۱- تثبیت نمونه‌ها ٤۱
۳-۱۱-۲- آماده سازی نمونه‌ها ٤۱
۳-۱۲- طرح آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها ٤۱

فصل چهارم: نتـــایج ٤۳
٤-۱- تاثیر باقی ماندن تخمک‌ها پس از اوولاسیون بر کیفیت تخمک ٤٤
٤-۲- تاثیر باقی ماندن تخمک‌ها پس از اوولاسیون بر پارامترهای مایع تخمدانی ٤۵
٤-۳- تاثیر باقی ماندن تخمک پس از اوولاسیون بر پارامترهای بیوشیمیایی تخمک ٤۵
٤-٤- ارتباط پارامترهای تخمک و مایع تخمدانی با کیفیت تخمک ٤۵
٤-۵- ارتباط بین متغیرهای مورد بررسی در تخمک و مایع تخمدانی ٤۹
٤-٦- تاثیر باقی ماندن تخمک پس از اوولاسیون بر ساختار تخمک از نظر بافت شناسی ۵۰

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری ۵۲
پیشنهادات ٦١
پیوست ٦٢
منابع ٦٦

فهرست جداول

جدول ۳-۱: برخی از مشخصات مرکز تکثیر و پرورش آزادماهیان شهید باهنر ۲۸
جدول ۳-۲: دستورالعمل تنظیم دستگاه اتوآنالایزر جهت اندازه‌گیری مقدار کلسیم ۳٤
جدول ۳-۳: دستورالعمل تنظیم دستگاه اتوآنالایزر جهت اندازه‌گیری مقدار آهن ۳۵
جدول ۳-٤: دستورالعمل تنظیم دستگاه اتوآنالایزر جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز ۳٦
جدول ۳-۵: دستورالعمل تنظیم دستگاه اتوآنالایزر جهت اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل ۳۷
جدول ۳-٦: دستورالعمل تنظیم دستگاه اتوآنالایزر جهت اندازه‌گیری مقدار کلسترول ۳۸
جدول ۳-۷: دستورالعمل تنظیم دستگاه اتوآنالایزر جهت اندازه‌گیری مقدار تری‌گلیسیرید ۳۹
جدول ۳-۸: دستورالعمل تنظیم دستگاه اتوآنالایزر جهت اندازه‌گیری مقدار گلوکز ٤۰
جدول ٤-۱: تاثیر باقی ماندن تخمک‌ها پس از اوولاسیون در حفره شکمی بر پارامترهای بقاء تخمک ٤٤
جدول ٤-۲: تاثیر باقی ماندن تخمک‌ها پس از اوولاسیون در حفره شکمی بر پارامترهای مایع تخمدانی ٤۵
جدول ٤-۳: تاثیر باقی ماندن تخمک‌ها پس از اوولاسیون در حفره شکمی بر پارامترهای بیوشیمیایی تخمک..... ٤٦
جدول ٤-٤: مدل‌های رگرسیون برای پیش‌بینی درصد چشم‌زدگی با استفاده از پارامترهای مایع تخمدانی و تخمک در طول فوق رسیدگی ٤۷
جدول ٤-۵: مدل‌های رگرسیون برای پیش‌بینی درصد تفریخ با استفاده از پارامترهای مایع تخمدانی و تخمک در طول فوق رسیدگی ٤۸
جدول ٤-٦: مدل‌های رگرسیون برای پیش‌بینی درصد ناهنجاری لاروی با استفاده از پارامترهای مایع تخمدانی و تخمک در طول فوق رسیدگی ٤۹
جدول ٤-۷: ارتباط‌های مهم فیزیولوژیک بین پارامترهای تخمک و مایع تخمدانی ۵۰

فهرست اشکال

شکل ۱-۱: دیاگرام فرایند تولید زرده در ماهیان استخوانی ۷
شکل ۱-۲: ساختار دیواره تخمک در ماهیان استخوانی ۸
شکل ۳-۱: شمای آماده سازی نمونه‌ها جهت مطالعه پارامترهای بقاء و پارامترهای فیزیولوژیکی
و بیوشیمیایی تخمک و مایع تخمدانی..... ۳۰
شکل ٤-۱: تغییرات درصد چشم زدگی، تفریخ و ناهنجاری لاروی در طول نگهداری تخمک
در زمان‌های مختلف در حفره شکمی ٤٤
شکل ٤-۲: تغییرات بافتی تخمک در ماهی آزاد دریای خزر در دوره فوق رسیدگی ۵۱
شکل ٤-۳: تصویر الکترونی سطح تخمک ماهی آزاد دریای خزر..... ۵۱

چکیده

به منظور تعیین بهترین زمان تخم‌کشی پس از اوولاسیون و بررسی زمان فوق رسیدگی تخمک در ماهی آزاد دریای خزر، تخمک‌ها به مدت ٤٠ روز پس از اوولاسیون در دمای ۷±۰/٦°c در حفره شکمی مولدین باقی ماندند. نمونه‌برداری از تخمک‌ها با فواصل ۱۰ روزه و در ٤ تیمار انجام شد و تخمک‌ها توسط مخلوط اسپرم ۸ مولد نر لقاح داده شدند. همچنین تخمک‌ها و مایع تخمدانی از نظر فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مورد مطالعه قرار گرفتند. طبق نتایج درصد چشم زدگی و تفریخ تخمک طی دوره‌های زمانی به شدت کاهش یافت به طوری که این میزان‌ها به ترتیب از ٦/٢٨±٩٠/٦٥ و ٦/٨٢±٨٦/٣٣ درصد برآورد شده در تخمک‌های تازه اوولـه شده (۱۰-۰ روز پس از اوولاسیون) به ١/٣٤±٠/٦٧ و ٠/٩٨±٠/٤٩ درصد در تخمک‌های فوق رسیده (٤٠-۳۰ روز پس از اوولاسیون) رسید. به هر حال درصد ناهنجاری لاروی تا ۳۰ روز پس از اوولاسیون ثابت بود. در طول دوره فوق رسیدگی تخمک، pH مایع تخمدانی به شدت کاهش و مقادیر گلوکز، پروتئین، کلسیم، آهن و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز به شدت افزایش یافت. به علاوه میزان پروتئین، تری‌گلیسیرید و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در تخمک بر اثر فوق رسیدگی تغییر کرد. در تخمک تازه اوولـه شده زرده دارای بافت همگن بود و قطر فضای پری ویتلین تفاوت چندانی نداشت اما با ایجاد فوق رسیدگی، زرده ناهمگن و حاوی گنجیدگی‌های متعددی شده و قطر فضای پری ویتلین آن در نقاط مختلف متفاوت گردید، در حالی که تغییری در قطر کوریون و وضعیت سوراخ میکروپیل حاصل نشد. این مطالعه نشان داد که بهترین زمان استحصال تخمک از ماهی آزاد دریای خزر، در دمای ۷±۰/٦°C تا ۱۰ روز پس از اوولاسیون می‌باشد. از بین فاکتورهای مورد بررسی در تخمک و مایع تخمدانی، کیفیت تخمک به میزان قابل توجه با فاکتورهای مایع تخمدانی (pH، پروتئین، آسپارتات آمینوترانسفراز، گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسیرید آهن و کلسیم) و فاکتورهای تخمک (کلسترول، تری‌گلیسیرید، آهن و آسپارتات آمینوترانسفراز) مرتبط بود که می‌توان از آنها به عنوان نشانگرهای کیفیت تخمک ماهی آزاد دریای خزر استفاده نمود.

کلمات کلیدی: تخمک، اوولاسیون، فوق رسیدگی، مایع تخمدانی، ماهی آزاد دریای خزر

مقدمه

آزادماهیان (*Salmonids*) از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی ماهیان در سراسر دنیا می‌باشند. پرورش آزادماهیان در اروپا به بیش از ٤٠٠ سال و در ایالات متحده آمریکا به حدود ۱۵۰ سال پیش باز می‌گردد (Whilloughby, 1999). تکثیر این ماهیان به منظور پرورش تجاری و همچنین بازسازی ذخایر آنها مورد توجه می‌باشند. به جهت اهمیت آنها در صید تفریحی و همچنین مصارف خوراکی، آزادماهیان به فراوانی پراکنش یافته و امروزه، تقریباً در تمامی آبهای مساعد پرورش می‌یابند.

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) یکی از ۹ زیر گونه قزل‌آلای قهوه‌ای (Brown trout) است که پراکنش آن به طور عمده در سواحل غربی و جنوبی دریای خزر است. این ماهی به منظور تولیدمثل نیازمند مهاجرت به رودخانه‌های منتهی به دریای خزر است ولی تغییر محیط رودخانه‌ها به واسطه‌ی آلودگی‌های انسانی، ایجاد موانع و سدها در مسیر مهاجرت این ماهیان و نیز صید بی‌رویه، جمعیت این ماهی را در معرض خطر انقراض قرار داده است. به منظور حفاظت از این گونه ارزشمند و کمک به بازسازی ذخایر آن، تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه‌ماهیان تولیدی به محیط طبیعی بعنوان راه‌حلی مؤثر در نظر گرفته شده است (بهرامیان، ۱۳۸۰). بر این اساس سالانه تعدادی مولد صید و پس از تکثیر و تولید بچه ماهی، آنها را به رودخانه‌های متصل به دریای مازندران رهاسازی می‌نمایند.

در چرخه‌ی زندگی ماهی آزاد در طبیعت، معمولاً مولدین ماده جهت تخمریزی با استفاده از ساقه‌ی دمی خود در کف رودخانه، شیارهایی را به نام redd می‌سازند. در واقع حفره‌هایی را در میان سنگریزه‌های تمیز و صاف در کف نهرها ایجاد می‌نمایند. ماهی نر در اطراف و نزدیکی باقی مانده و رقبا را دور می‌سازد. پس از آن که لایه‌ی شیار مانند آماده شد، مولد ماده تخمک‌ها را در آنجا رها می‌سازد. مولد نر بلافاصله عمل اسپرم‌ریزی را انجام داده و لقاح صورت می‌پذیرد. تخم‌ها توسط مولد ماده از سنگریزه پوشانده می‌شوند و پس از آن هر دو مولد لانه را ترک نموده و آنها را به حال خود می‌گذارند تا مراحل تکامل جنین و رشد لاروها صورت گیرد. لاروهای تازه تفریخ شده که آلوین[1] نامیده می‌شوند، تقریباً تا مدت یک هفته قبل از شروع تغذیه‌ی فعال در میان سنگریزه‌ها باقی می‌مانند (Whilloughby, 1999).

در شرایط پرورشی تخمک‌ها پس از اوولاسیون (رها شدن تخمک از لایه‌های فولیکولی)، به محوطه‌ی شکمی رها شده و تا زمان استحصال آنها توسط عمل تخم‌کشی، در آن جا باقی می‌مانند. در طی این دوره، تخمک‌ها در مایع نیمه چسبناک و نسبتاً غلیظی به نام مایع تخمدانی یا مایع سلومیک غوطه‌ور هستند. به نظر

[1] - Alevin

می‌رسد که ترکیب مایع سلومیک، در حفظ قابلیت لقاح و کیفیت تخمک‌ها نقش مهمی را ایفا نماید. با به تأخیر افتادن عمل تخم‌کشی، به تدریج تغییراتی در ترکیب مایع سلومیک و محتوا و ساختار تخمک‌ها ایجاد می‌شود که احتمالاً همین تغییرات مرفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مسئول کاهش کیفیت تخمک‌ها، کاهش درصد لقاح، چشم‌زدگی، تفریخ و بروز ناهنجاری‌ها و تلفات در مراحل بعدی می‌باشند (Lahnsteiner, 2000). چنانچه عمل تخم‌کشی بیش از این مدت به تأخیر بیفتد، تخمک‌ها فوق رسیده می‌شوند. با به وجود آمدن حالت فوق رسیدگی، امکان قابلیت لقاح تخمک‌ها به طور کلی از بین می‌رود. زمان ایجاد فوق رسیدگی، به شدت تحت تأثیر دمای محیط آبی زندگی ماهی و گونه قرار دارد (Escaffre and Billard, 1979).

تخمک‌های آزاد ماهیان در مقایسه با سایر گونه‌های ماهیان، بزرگ‌تر بوده و در تعداد کمتری ظاهر می‌گردند. به طوری که یک مولد ماده، به طور متوسط تنها حدود ۱۰۰۰ تا ۳۰۰۰ تخمک دارد (Whilloughby, 1999). لذا با توجه به محدود بودن تخمک‌ها در مولدین ماده‌ی آزاد ماهیان نسبت به سایر ماهیان پرورشی، ضرورت توجه به فاکتورهای مؤثر بر کیفیت تخمک‌ها آشکارتر می‌شود و از آن جا که زمان تخم‌کشی از مولدین با توجه به زمان اوولاسیون، مهم‌ترین فاکتور تعیین کننده‌ی کیفیت تخمک گزارش شده است (Craik and Harvey, 1984)، اهمیت تحقیق مشخص می‌گردد. در واقع به منظور استحصال بهترین تخمک‌ها از جهت کیفیت، توجه به فاصله‌ی زمانی مناسب بین اوولاسیون و تخم‌کشی از مولدین ضروری است. پژوهش حاضر به بررسی بهترین فاصله‌ی زمانی ما بین اوولاسیون و تخم‌کشی در مولدین ماده ماهی آزاد دریای خزر به عنوان یک گونه‌ی بومی در معرض خطر انقراض می‌پردازد که به تبع آن بالاترین نرخ چشم‌زدگی و تفریخ نیز حاصل خواهد شد.

همچنین در آزاد ماهیان وجود آزمایش‌های ساده، سریع و قابل اعتماد برای پیش‌بینی کیفیت تخمک با کمبود مواجه‌اند. برای حصول این امر با توجه به این که در طی دوره پس از اوولاسیون به تدریج تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در تخمک و مایع تخمدانی ایجاد می‌شود، لذا بررسی این تغییرات و تعیین حدود آستانه افت کیفیت تخمک برای هر یک از فاکتورهای متغیر در این دوره می‌تواند برای پیش‌بینی قابل اعتماد از کیفیت تخمک و عملکرد مراحل بعدی آن مفید واقع شود.

در این تحقیق به منظور دستیابی به اطلاعات بیشتر در مورد فوق رسیدگی تخمک و تعیین نشانگرهایی جهت پیش‌بینی کیفیت تخمک در ماهی آزاد دریای خزر، تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی که پس از اوولاسیون تا فوق رسیدگی در تخمک و مایع تخمدانی ایجاد می‌شود مورد بررسی قرار گرفت. به ویژه

پاسخ به سوالات زیر برای درک موضوع و کمک به افزایش میزان تفریخ در این ماهی مورد توجه بوده است.

۱- باقی ماندن تخمک‌ها پس از اوولاسیون در محوطه شکمی با توجه به میانگین دمای موجود در مرکز تکثیر، چگونه بر کیفیت تخمک‌ها تاثیر گذاشته و حدود آستانه افت کیفیت تخمک چه زمانی است؟

۲- آیا ساختار تخمک مانند سوراخ میکروپیل، کوریون، کورتیکال آلوولای، فضای پری‌ویتلین و زرده با بروز فوق رسیدگی تغییر می‌کند؟

۳- از بین فاکتورهای مهم بیوشیمیایی تخمک و مایع تخمدانی که ارتباط آنها با کیفیت تخمک در آزاد ماهیان مورد مطالعه قرار گرفته است (Craik and Harvey, 1984; Lahnsteiner *et al.*, 1999; Lahnsteiner, 2000)، تغییرات آنها در اثر فوق رسیدگی تخمک ماهی آزاد دریای خزر چگونه بوده و آیا بین این فاکتورها و کیفیت تخمک ارتباطی وجود دارد؟ در این ارتباط، فاکتورهای مربوط به متابولیسم کربوهیدرات مانند گلوکز، چربی مانند کلسترول و تری گلیسیرید و پروتئین از آن جهت که اطلاعات مهمی را در مورد منابع انرژی تخمک حاصل می‌کنند (Lahnsteiner *et al.*, 1999)، کلسیم و آهن که از یون‌های مهم جهت فعالیت‌های متابولیکی جنین بوده و به ترتیب در شکل گیری اسکلت و خون سازی آن نقش دارند (Evans and Claiborne, 2005) و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز که جزء آنزیم‌های سیتوپلاسمی بوده و به عنوان نشانگر انسجام غشاء پلاسمایی تخمک مطرح است (Lahnsteiner *et al.*, 1999; Lahnsteiner, 2000) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین این فاکتورها در مایع تخمدانی به عنوان محیط در برگیرنده و نگهدارنده تخمک‌های اوولە شده که هر گونه تغییر در تخمک می‌تواند بر ویژگی‌های آن به ویژه pH موثر باشد نیز (Lahnsteiner, 2000) مورد بررسی قرار گرفت.

فصل اول

کلیـــات

۱-۱- مدیریت مولدین در تکثیر مصنوعی

در پرورش آزادماهیان مدیریت کارآمد مولدین، بستگی به پیش‌بینی دقیق زمان رسیدگی جنسی، به منظور استحصال بهترین تخمک‌ها از جهت کیفیت دارد. هم در مواردی که تکنیک‌های تکثیر به صورت القاء هورمونی و تسریع در عمل تخمریزی بوده و هم زمانی که این عمل به صورت خودبه‌خود صورت گیرد، وجود دانش صحیح مرتبط با رسیدگی گنادها ضروری است (Schreck and Moyle, 1990). همان طور که کیفیت تخمک در ذخایر طبیعی ماهیان، متفاوت است، در ماهیان پرورشی نیز بسیار متفاوت بوده و ممکن است به صورت یک فاکتور محدود کننده برای تکنیک‌های لقاح مصنوعی و تولید موفق انبوه لاروهای ماهیان درآید (Aegerter and Jalabert, 2004). در تکثیر مصنوعی حذف سلول‌های جنسی با کیفیت پایین نقش مهمی را در تولید ماهیان خوب و استفاده بهینه از تاسیسات تفریخگاهی بازی می‌کند. در واقع یک مرکز تکثیر، زمانی می‌تواند به حداکثر پتانسیل تولید خود دست یابد که بتواند مولدینی با کیفیت تخم و لارو بالا را به صورت منظم و دائم فراهم نماید (Bromage *et al.*, 1992).

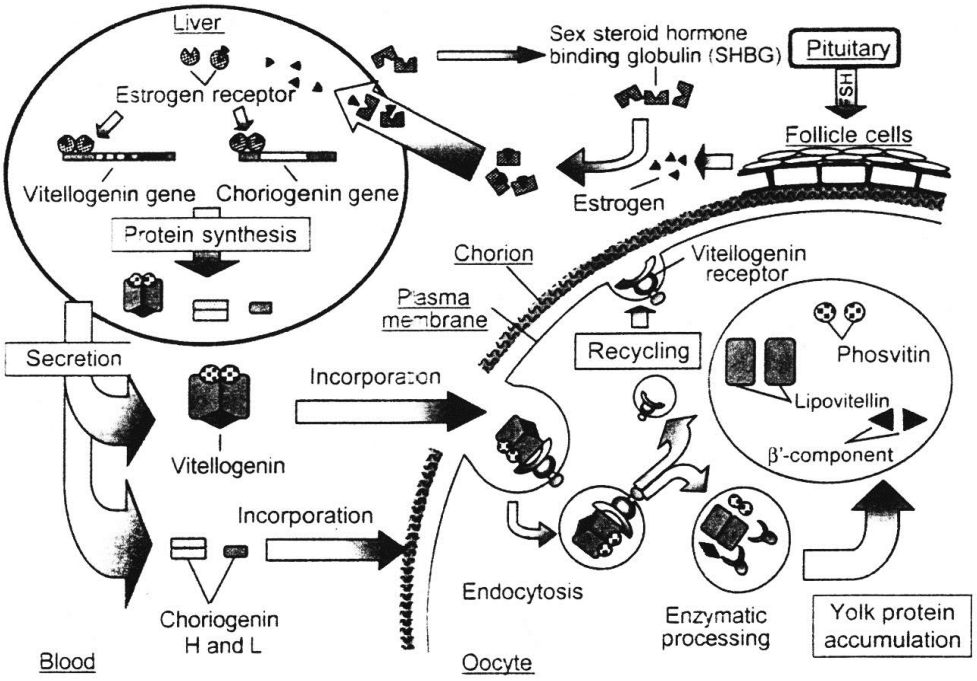
۱-۲- ترکیب بیوشیمیایی تخمک

ترکیب بیوشیمیایی تخمک ماهیان به طور کلی در گونه‌های مختلف، متفاوت است (Mommsen and Moon, 2005).

تخم ماهیان از پروتئین، چربی، کربوهیدرات و مواد معدنی تشکیل شده است که نسبت این مواد به هم با توجه به اندازه تخم، سن مولدها و نحوه تغذیه آنها می‌تواند متفاوت باشد. اصولاً پروتئین ماده اصلی وزن خشک تخمک ماهیان را تشکیل می‌دهد (٪۸۹-۳۵) و در آزاد ماهیان ۹۰-۸۰ درصد وزن خشک تخمک اووله شده را پروتئین تشکیل می‌دهد. میزان چربی تخمک می‌تواند ٥٤-۳ درصد وزن خشک آن باشد. همان طور که قابل پیش‌بینی است، مقدار چربی تخمک با فاصله زمانی بین تخم‌ریزی، تفریخ و شروع تغذیه فعال ارتباط دارد به طوری که هر چه دوران انکوباسیون طولانی‌تر باشد، میزان چربی تخم بیشتر است. زمانی که تخم‌ها لقاح می‌یابند و جنین شروع به رشد می‌کند، کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها مصرف می‌شوند. البته مصرف چربی‌ها و پروتئین‌ها بیشتر بعد از تفریخ می‌باشد (Mommsen and Moon, 2005).

زرده که از مجموع پروتئین‌ها و چربی‌ها تشکیل شده است حاصل فرایند وتیلوژنز یا زرده‌سازی است و انرژی لازم برای رشد جنینی را فراهم می‌کند. زرده از مقادیر متفاوت فسفولیپیدها، تری‌گلیسیریدها و کلسترول تشکیل می‌شود. سنتز زرده توسط سلول‌های کبد، در اثر یک سیکل هیپوتالاموس – هیپوفیز –

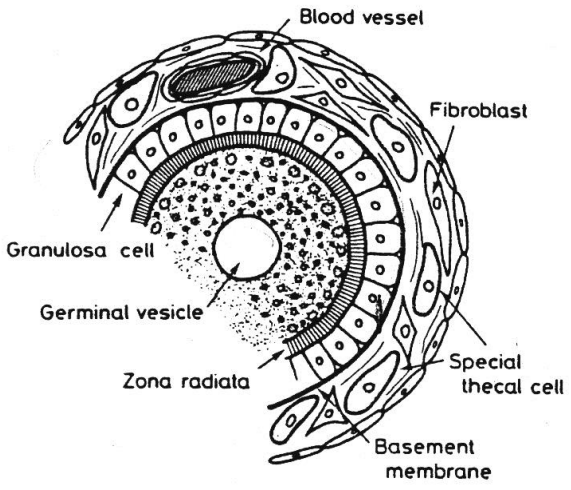
سیستم عصبی هورمونی گناد انجام می‌شود که خود تحت تاثیر سیگنال‌های خارجی و محیطی است. این ترکیبات بعد از ساخت به جریان خون آزاده شده و توسط اووسیت در حال رشد جذب و تحت تاثیر فعالیت آنزیم‌های آن به پروتئین‌های زرده تبدیل می‌شود. لیزوزوم حاوی کاتپسین D و احتمالاً آنزیم‌های دیگر است که ویتلوژنین را به پروتئین‌های زرده تبدیل می‌کند. ویتلوژنین یک گلیکوفسفوپروتئین است که بعد از جذب توسط اووسیت به دو گروه پروتئین تبدیل می‌شود: Lipovitellin (LV) و Phosvitin (PV). لیپوویتلین که ۲۰ درصد زرده را شامل می‌شود یک مولکول لیپوپروتئینی بزرگ و در واقع بزرگ‌ترین ترکیب حاصل از ویتلوژنین است و خود از دو زنجیره پلی‌پپتیدی سنگین (LVH) و سبک (LVL) تشکیل می‌شود. عملکرد اصلی لیپوویتلین به عنوان منبع تامین آمینواسیدها و چربی‌ها برای رشد جنینی است. فسویتین حدود ۵۰ درصد از سرین تشکیل شده که فسفات از طریق پیوند کووالانسی و کلسیم توسط پیوند یونی به آن متصل است. در نتیجه فسویتین مواد معدنی مورد نیاز برای شکل‌گیری اسکلت و فعالیت‌های متابولیکی جنین را فراهم می‌کند (شکل ۱-۱). همزمان با رشد اووسیت، وزیکول‌های زرده از نظر اندازه و تعداد افزایش یافته و در اووسیت بالغ به حاشیه اووسیت حرکت کرده و به عنوان کورتیکال آلوولای نامیده می‌شوند. در هنگام لقاح ترکیبات کورتیکال آلوولای به فضای پری‌ویتلین رها می‌شود (Evans and Claiborne, 2005).



شکل ۱-۱: دیاگرام فرایند تولید زرده در ماهیان استخوانی (Evans and Claiborne, 2005)

۱-۳- مورفولوژی دیواره تخمک

هر اووسیت در طول مراحل اولیه رشد خود توسط دو لایه سلولی اصلی پوشیده می‌شود. لایه بیرونی که به نام تکال[1] نامیده می‌شود و لایه درونی به نام گرانولوزا[2] که این دو لایه توسط یک غشاء پایه[3] از یکدیگر جدا می‌شوند. یکی از جالب‌ترین اتفاقاتی که در طول رسیدگی تخمک ایجاد می‌شود تشکیل یک ناحیه قطور و بسیار تمایز یافته بین لایه سلولی گرانولوزا و اووسیت است که شامل غشاء تخمک، فضای پری‌ویتلین و زونارادیاتا می‌باشد. بر اساس گونه و همچنین مرحله رشدی اووسیت، قطر دیواره تخمک متفاوت است و از ۸-۷ میکرون در اووسیت کاملاً تکامل یافته ماهی حوض (*Carassius auratus*) تا حدود ۳۰ میکرون در قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌رسد. بخشی از دیواره تخمک دارای ظاهری مخطط است و تحت نام زونارادیاتا[4] نامیده می‌شود. این ظاهر مخطط مربوط به نفوذ میکروکرک‌ها و زائده‌های اووسیت و سلول‌های فولیکولی است (شکل ۱-۲). این دیواره عمدتاً از کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها تشکیل شده است. مکانیسم شکل‌گیری دیواره تخمک در ماهیان استخوانی دقیقاً تعیین نشده است. این مسئله که آیا دیواره تخمک از سلول‌های فولیکولی یا از اووسیت و یا هر دو منشاء گرفته است، هنوز مورد سوال است (Hoar et al., 1983).



شکل ۱-۲: ساختار دیواره تخمک در ماهیان استخوانی (Hoar et al., 1983)

دیواره تخمک ماهیان استخوانی در برخی نقاط از نظر ساختاری تغییر کرده و حفره کوچکی به نام

[1] - Thecal
[2] - Granulosa
[3] - Basement membrane
[4] - Zona radiata

میکروپیل[1] را ایجاد می‌کند که اسپرم از طریق آن می‌تواند بـه تخمـک دسترسـی یابـد. میکروپیـل در قطـب حیوانی قرار دارد. قطر خارجی میکروپیل در تخمک *Fundulus heteroclitus* حـدود ۲/۵ میکـرون و قطـر داخلی آن ۱/۵-۱ میکرون است (Dumont and Brummett, 1980). به نظر می‌رسد که سوراخ میکروپیل به وسیله سلول‌های فولیکولی بسیار تخصص یافته تشکیل می‌شود. سلول میکروپیلار که تخصصی‌ترین سـلول لایه فولیکولی است از نظر ظاهری به راحتی از سایر سلول‌های گرانولوزا قابل تشخیص اسـت. ایـن سـلول بزرگ و مثلثی شکل بوده و در کانال میکروپیل قرار دارد. ساختار ویژه میکروپیلار بیان می‌کند که این سلول تنها به عنوان درپوش سوراخ میکروپیل عمل نمی‌کند بلکه نقش ترشحی نیز دارد. ایـن مسـئله قابـل توجـه است که تجمع اسپرم در اطراف سوراخ میکروپیل در مراحل اولیه لقاح به صورت انتخابی صورت می‌گیـرد (Hoar *et al*., 1983).

۱-٤- اوولاسیون و عوامل دخیل در آن

۱-٤-۱- تعریف اوولاسیون

در آزادماهیان، تخمک‌ها بر اثر شکاف کیسه تخمدان وارد حفره‌ی بدنی شده و توسط روزنه‌ی تناسـلی که در قسمت خلفی مخرج قرار دارد، به خارج از بدن انتقال می‌یابند. عمل رها شـدن تخمـک از لایـه‌هـای فولیکولی، یعنی لایه‌های نگهدارنده‌ی تخمک در تخمدان، و ورود آن به محوطه‌ی شکمی را اوولاسـیون یـا تخمک‌گذاری می‌نامند. مطالعه با میکروسکوپ الکترونی نشان داده است کـه میکروکـرک‌هـای سـلول‌هـای فولیکولی در زمان نزدیک به اوولاسیون، خود را از دیـواره تخمـک جـدا کـرده و یـک فضـای وسـیع بـین سلول‌های فولیکولی و دیواره تخمک ایجاد می‌شود. به نظر می‌رسد آنزیم‌های پروتئولیتیک در قطـع ارتبـاط فولیکول – اووسیت دخالت داشته باشند. همچنین سلول میکروپیلار که یک سلول فولیکولی ویـژه اسـت و در طول رسیدگی اووسیت روی میکروپیل را می‌پوشاند، در ایـن زمـان از آن جـدا مـی‌شـود (Evans and Claiborne, 2005).

۱-٤-۲- کنترل هورمونی اوولاسیون

در سیر تکاملی روند تولیدمثل در ماهیان، به دنبال مرحله‌ی Vitellogenesis، مرحلـه‌ی Preovulation

[1] - Micropyle

و Ovulation قرار دارد. برای بروز و تکمیل مرحله‌ی Ovulation، یک نوع مرگ سلولی بایستی در سلول‌های لایه‌های thecal و granulosa (لایه‌های فولیکولی) صورت گیرد تا تخمک‌های رسیده رهاسازی شوند. مراحل مختلف تکاملی دارای خصوصیات هورمونی و ویژگی‌های خاص خود می‌باشند. مثلاً در مرحله‌ی Vitellogenesis، هورمون‌های GTHI، 17β-estradiol (E2) و Growth Factor (GF)، هورمون‌های شاخص می‌باشند. در مقابل در مرحله‌ی Ovulation، هورمون GTHII به عنوان هورمون شاخص بوده و GnRH نیز نقش محرک برای بروز و تکمیل این مرحله را دارد. لذا هورمون‌های GTHI، E2 و GF عمل مرگ سلولی لایه‌های فولیکولی را به تأخیر انداخته و هورمون‌های GnRH و GTHII بروز این حالت را در سلول‌های مذکور تسریع می نمایند. (Weil and Marcuzzi, 1990; Janz and Kraak, 1997; Breton *et al*., 1998).

مکانیسم عمل به این صورت است که ابتدا گنادوتروپین اولیه (GTHI) مترشحه از هیپوفیز، در سلول‌های سوماتیکی تخمدان، ترشح هورمون استروئیدی (E_2 (17β-estradiol) را موجب می‌گردد. این هورمون پس از ترشح و رها شدن در خون، به سلول‌های Hepatocyte در کبد رفته و باعث تولید زرده[1] می‌گردد که پس از ترشح در خون به داخل تخمک رفته و در آن تجمع می‌یابد. این تجمع تا مرحله‌ی آخر زرده‌سازی[2] ادامه می‌یابد. در انتهای این دوره ترشح GTHI به میزان زیادی کاهش یافته و به جای آن ترشح گنادوتروپین ثانویه (GTHII) آغاز می‌گردد که خود در لایه‌های فولیکولی موجب ترشح هورمون‌های (Maturation Inducing Hormone) MIH می‌شود. تغییرات مورفولوژیک مرتبط با رسیدگی اووسیت مانند آبگیری اووپلاسم و شفاف شدن تخمک نیز مستقیماً تحت تاثیر MIH قرار دارد. از این دسته بیشترین هورمون تأثیرگذار در رسیدگی نهایی تخمک آزادماهیان، (17α-hydroxy-20β-dihydroprogesterone) DHP تشخیص داده شده که اجرای عمل GVBD (Germinal Vesicle Break Down) را موجب می‌گردد (Peter, 1981; Scott *et al*., 1983; Scott *et al*., 1984; Liley *et al*., 1986).

۱-٤-۳- نقش دما در ایجاد اوولاسیون

دما در ایجاد فرآیند اوولاسیون مؤثر است. تحقیقات نشان داده است که نگهداری مولدین ماده ماهی آزاد

[1] - Vitelline
[2] - Vitellogenesis

اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) در دمای $٦^{\circ}C$ در مقایسه با نگهداری آنها در دمای $١١^{\circ}C$ موجب تسریع در عمل اوولاسیون می‌گردد، در حالی که در دمای $١٦^{\circ}C$ عمل اوولاسیون اتفاق نیفتاده و تا زمانی که دما به $٨^{\circ}C$ تقلیل نیابد، اوولاسیون صورت نمی‌گیرد (King and Pankhurst, 2004). همچنین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری ماهیان در دمای بیش از $١٢^{\circ}C$، موجب عدم ایجاد اوولاسیون در تعدادی از ماهیان می‌شود (Pankhurst *et al*., 1996; Pankhurst and Thomas, 1998).

١-٤-٤- تشخیص ایجاد اوولاسیون

در روز اوولاسیون، میزان هورمون DHP(17α-hydroxy-20β-dihydroprogesterone) در خون به حداکثر میزان خود رسیده و لذا با اندازه‌گیری این هورمون می‌توان زمان اوولاسیون را معین نمود (Springate *et al*., 1984) در بعد عملی، این روش هزینه‌بر بوده و تنها جهت کارهای تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. هر چه مولدین ماده به زمان اوولاسیون نزدیک‌تر می‌شوند، محوطه‌ی شکمی آنها تیره‌تر و نرم‌تر می‌گردد. لیکن، تشخیص دقیق زمان اوولاسیون از جهت ظاهری امکان‌پذیر نبوده و جهت این امر، نیاز به دستکاری روزانه‌ی مولدین و در واقع معاینه‌ی آنها می‌باشد (Aegerter and Jalabert, 2004). در واقع، از جهت عملی، اولین روزی که با اعمال فشار آرام به محوطه‌ی شکمی مولدین ماده، تخمک‌ها خارج گردند، روز اوولاسیون در نظر گرفته می‌شود (Springate *et al*., 1984).

١-٥- کیفیت تخمک در آزادماهیان

١-٥-١- فاکتورهای مؤثر بر کیفیت تخمک

کیفیت تخمک در آزادماهیان به عوامل متعددی چون نحوه ی تغذیه‌ی مولدها، سن آنها و شرایط بهداشتی آنها بستگی دارد. به طور مثال مقدار پروتئین جیره و رنگدانه‌های آن مانند β-کاروتن و کانتاگزانتین و ویتامین‌های E و C و گروه B بر هم‌آوری و کیفیت تخمک‌ها از طریق تاثیر بر تنفس آنها تأثیرگذار می‌باشند و موجب بهبود رشد لارو ماهی در مراحل تغذیه‌ی اولیه می‌گردند (Schreck and Moyle, 1990). در آزادماهیان تغییر در کیفیت تخمک‌ها به دلیل تأثیر باقی ماندن آنها در محوطه‌ی شکمی پس از اوولاسیون می‌باشد (Aegerter and Jalabert, 2004).

مطالعات زیادی جهت مشخص نمودن فاکتورهای مؤثر بر کیفیت تخمک صورت گرفته است و در بین این فاکتورها، فوق رسیدگی تخمک به عنوان یک فاکتور مهم مؤثر بر بقاء تخم‌ها در بسیاری از گونه‌های

پرورشی شناسایی گردیده است (Gaudemar and Beall, 1998). نتایج نشان می‌دهند که زمان تخم‌کشی از مولدین با توجه به روز تخمک‌گذاری، مهم‌ترین فاکتور تعیین کننده‌ی کیفیت تخمک نسبت به سایر فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی ترکیب تخمک‌ها است که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Craik and Harvey, 1984). باقی ماندن بیش از حد تخمک در محوطه‌ی شکمی، با کاهش قابل ملاحظه‌ی کیفیت تخمک همراه خواهد بود که این کاهش کیفیت به صورت کاهش بقاء جنین و افزایش ناهنجاری‌های مرفولوژیک و ایجاد سطوح مختلف پلوئیدی (تری، تترا و ...) مشخص می‌گردد. بنابراین، شناخت دقیق ویژگی‌های مراحل پس از اوولاسیون که با موفقیت مراحل توسعه‌ی جنینی و تخمین زمان پس از اوولاسیون و کیفیت تخمک‌ها در ارتباط است، ضروری به نظر می‌رسد (Aegerter and Jalabert, 2004).

۱-۵-۲- تعیین کیفیت تخمک

طبق مطالعه Lahnshteiner *et al*., (1999) در قزل‌آلای دریاچه‌ای، تخمک‌های نارنجی تا زرد رنگ با ظاهر یکنواخت دارای کیفیت بالایی هستند و تخمک‌های با رنگ زرد کم رنگ و سفید کیفیت پایینی دارند. اما توجه به ظاهر تخمک‌ها می‌تواند تنها یک وسیله تقریبی برای تعیین تخمک‌های نامرغوب باشد.

پیش داوری در تعیین کیفیت گامت‌ها، بدون اندازه گیری درصد لقاح بسیار مشکل است. در واقع آزمایشات و تست‌های سریع و قابل اعتماد برای پیش‌بینی کیفیت تخمک ها با کمبود مواجه هستند (Schreck and Moyle, 1990). لذا اندازه‌گیری صحیح کیفیت تخمک‌ها، در تعیین میزان درصد لقاح، چشم‌زدگی، تفریخ و در نظر گرفتن نرخ ناهنجاری‌ها و سطح تریپلوئیدی ضروری است (Aegerter and Jalabert, 2004).

۱-٦- فوق رسیدگی در تخمک

در طبیعت تخمک‌های رسیده ی آزادماهیان، در هنگام اوولاسیون (آزاد شدن تخمک از لایه‌های فولیکولی و سیال شدن آن) به محوطه‌ی شکمی رها شده و تا زمان تحریک عمل تخمریزی توسط محرکین خارجی، در آن جا باقی می‌مانند. در طی این دوره، تخمک‌ها در مایع نیمه چسبناک و نسبتاً غلیظی به نام مایع سلومیک یا مایع تخمدانی غوطه‌ورند. به نظر می‌رسد که ترکیب مایع سلومیک، در حفظ قابلیت لقاح و کیفیت تخمک‌ها نقش مهمی را ایفا نماید (Rime *et al*., 2004). در شرایط پرورشی، محرکین خارجی

وجود نداشته و بنابراین تخمک‌ها تا زمان استحصال آنها توسط عمل تخم‌کشی به صورت دستی در محوطه‌ی شکمی باقی می‌مانند. چنانچه عمل تخم‌ریزی در محیط‌های طبیعی و عمل تخم‌کشی در شرایط پرورشی به هر دلیلی به تأخیر بیفتد، تخمک‌ها فوق رسیده شده و به تدریج باز جذب می‌گردند (Aegerter and Jalabert, 2004).

۱-٦-۱- زمان ایجاد پدیده‌ی فوق رسیدگی در تخمک

افراد گوناگونی تأثیرات باقی ماندن تخمک را در محوطه‌ی شکمی مولدین ماده بررسی نموده و دریافته‌اند مدت زمانی که تخمک در طی آن بقاء دارد، برای گونه‌های مختلف، متفاوت است (Mollah and Tan, 1983) و بستگی به درجه‌ی حرارت محیط آب دارد (Billard and Gillet, 1981).

به طور مثال، کیفیت تخمک‌های ماهی بس مخطط (Striped bass) در عرض ۳۰ دقیقه پس از اوولاسیون، کاهش می‌یابد و کارکنان بخش تکثیر بایستی از وقوع اوولاسیون، پیش‌بینی صحیحی داشته باشند، به طوری که ماهیان نر رسیده و یا نمونه‌های اسپرم را برای امر تکثیر در این دوره‌ی زمانی محدود آماده نمایند (Schreck and Moyle, 1990).

همچنین زمان ایجاد پدیده ی فوق رسیدگی به شدت تحت تاثیر دمای محیط زندگی ماهی است. به طوری که با افزایش درجه‌ی حرارت، مدت زمان لازم جهت ایجاد حالت فوق رسیدگی در تخمک کاهش می‌یابد (Mohagheghi Samarin *et al*., 2008).

۱-٦-۲- علائم ظاهری فوق رسیدگی

فوق رسیدگی با ایجاد علائمی در تخمک‌ها همراه است. در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد دریای خزر، تخمک به رنگ زرد مایل به نارنجی می‌باشد. هر چه رنگ تخمک به نارنجی بیشتر متمایل باشد، تخمک از کیفیت بالاتری برخوردار خواهد بود. بر روی تخمک فوق رسیده‌ی دو گونه فوق، یک لکه‌ی پررنگ‌تر نارنجی مشخص می‌گردد که با اندکی دقت به آسانی قابل تشخیص است. همچنین تخمک‌های فوق رسیده در حین لقاح و شستشو سفید رنگ می‌شوند و لیکن لکه‌ی نارنجی رنگ همچنان باقی می‌ماند. در تخمک‌های استحصال شده از مولدین ممکن است تنها درصد کمی فوق رسیده باشند. با گذر چندین روز به تدریج تمامی تخمک‌ها در چنین مولدی فوق رسیده خواهند شد. لذا عمل فوق رسیدگی یکباره و در یک روز در تمامی تخمک‌ها اتفاق نمی‌افتد. همچنین تخمک‌های فوق رسیده در حین

آب کشیدگی[1] سفت و سخت نمی‌گردند، در حالی که در تخم‌های حاصل از تخمک‌های سالم، عمل آب کشیدگی و سفت و سخت شدن تخم‌ها در طی مدت زمان کوتاهی صورت می‌گیرد (Lahnsteiner, 2000).

۱-۷- اثرات باقی ماندن تخمک پس از اوولاسیون در محوطه ی شکمی بر رفتارهای تخم‌ریزی

اثرات ماندگاری تخمک در محوطه‌ی شکمی پس از اوولاسیون، بر کیفیت آن در شرایط پرورشی، توسط افراد متعددی مورد مطالعه قرار گرفته است (Craik and Harvey, 1984; Lahnsteiner, 2000; Aegerter and Jalabert, 2004; Rime *et al*., 2004). لیکن، در مورد این امر در محیط‌های طبیعی مطالعات کمتری صورت گرفته است.

باقی ماندن تخمک در محوطه‌ی شکمی پس از اوولاسیون، در ماهیان مولد در طبیعت، به خصوص زمانی که تغییرات زیست‌محیطی مربوط به تأثیر فعالیت‌های انسانی باشد، به عنوان یک فاکتور مهم در نظر گرفته می‌شود. عواملی چون ساخت سدها و ایجاد مسیرهای مهاجرتی برای ماهیان از جمله دلایل تأخیر در امر مهاجرت آزادماهیان عنوان شده‌اند. چنانچه این دلایل موجب تأخیر در تخم‌ریزی و ایجاد حالت فوق رسیدگی گردند، می‌توانند الگوها و کارآیی فعالیت‌های تولیدمثلی را تحت تأثیر قرار دهند (Gaudemar and Beall, 1998).

نگهداری طولانی مدت تخمک‌ها به ندرت در محیط‌های طبیعی مشاهده می‌شود و معمولاً مربوط به تأثیر فاکتورهای محیطی نظیر تراکم مولدین ماده و تغییرات سرعت جریان آب در فصل تکثیر می‌باشد (Manzer and Miki, 1986; Bagliniere *et al*., 1990). لیکن، توسعه‌ی ساخت سدها که یکی از دلایل اصلی کاهش ذخایر آزادماهیان می‌باشد، ممکن است بر فرآیند تخمریزی تأثیرگذار باشد. در محیط‌های نامناسب، مولدین ماده فعالیت‌های تخمریزی خود را به تأخیر انداخته، حفره‌هایی را حفر می‌نمایند و بدون آن که تخمریزی کنند آنها را ترک می‌نمایند (Crisp and Carling, 1989; Barlaup *et al*., 1994). بنابراین موارد فوق‌الذکر ممکن است موجب ایجاد حالت فوق رسیدگی تخمک آزادماهیان در محیط‌های طبیعی گردد.

آن چه دلیل ایجاد فوق رسیدگی باشد، یکی از مهم‌ترین مسائل در پرورش آزادماهیان می‌باشد (Lam *et al*., 1978). در مورد آزادماهیان پرورشی، تلفات بالای ناشی از فوق رسیدگی بسیار قابل ملاحظه است (Springate *et al*., 1984). این امر نقش مهمی را هم بر رفتارهای تخمریزی و هم بر توانایی

[1] - Hydration

تخمریزی دارد. در مطالعه‌ای که پیرامون این مسأله صورت گرفت، ماهیان مولد ماده‌ای که تخمک‌ها را به مدت یک هفته پس از تاریخ اوولاسیون در محوطه‌ی شکمی نگه داشته بودند، نسبت به ماهیان مولد ماده‌ای که تخمک‌های آنها تازه اووله شده بود، سریعتر تخمریزی نموده و فاصله‌ی زمانی بین اولین و آخرین تخمریزی آنها در یک دوره‌ی تخمریزی کوتاه‌تر بود (Gaudemar and Beall, 1998).

مطالعات نشان می‌دهند که مولدین ماده می‌توانند با تغییر در دوره‌ی فعالیت تخمریزی خود مولدین نر را تحت تأثیر قرار دهند. به طور مثال با تأخیر در امر تخمریزی، مولدین نر بهتری امکان حضور می‌یابند. در واقع ممکن است مولدین ماده در زمانی که توسط مولدین نر نسبتاً کوچک احاطه شده باشند، فعالیت تخمریزی خود را به تأخیر بیندازند تا مولدین نر بهتری جایگزین گردند. لیکن، با منتظر شدن و امتحان مولدین نر مختلف توسط مولدین ماده، ریسک فوق رسیده شدن تخمک‌ها افزایش می‌یابد. بنابراین، مولدین ماده‌ای که تخمک‌های آنها به زمان فوق رسیدگی نزدیک‌ترند، در انتخاب مولد نر تبعیض کمتری را قایل شده و لذا تعجب‌آور نیست که آنها تخمک‌های خود را سریع‌تر رهاسازی نمایند. فوق رسیدگی با تغییرات هورمونی و ترشحات غدد درون ریز در ماهیان همراه است که بر رفتارهای تخمریزی مولدین ماده، تأثیر می‌گذارد (Liley *et al*., 1986).

همچنین در ماهیان ماده‌ای که دارای تخمک‌های فوق رسیده هستند، تمایل برای انتخاب مولدین نر کاهش می یابد. در تصدیق این گفته بایستی عنوان نمود که دیده شده است مولد ماده‌ای که از زمان اوولاسیون تخمک‌هایش ۱۲ روز می‌گذشته، به تنهایی تخمریزی نموده است، در حالی که مولد نر از محل لانه به دور بوده است. چنین رفتار تخمریزی، هرگز در مولدین ماده‌ای که تخمک‌های آنها به تازگی اوولـه شده‌اند، مشاهده نشده است (Gaudemar and Beall, 1998). همچنین پدیده ی فوق رسیدگی بر توانایی تخمریزی مولدین ماده تأثیر منفی دارد. در نهایت بایستی عنوان نمود که باقی ماندن تخمک در محوطه‌ی شکمی پس از اوولاسیون، به عنوان یک فاکتور اساسی برای آزادماهیان در محیط‌های طبیعی عنوان می‌گردد. چرا که نه تنها بر موفقیت آنها در امر تخم‌ریزی مؤثر است، بلکه احتمالاً بر انتخاب مولدین نر و به موجب آن بر ساختار ژنتیکی نسل‌های آینده تأثیرگذار خواهد بود.

۱-۸- اثرات باقی ماندن تخمک پس از اوولاسیون در محوطه‌ی شکمی بر مورفولوژی و ترکیب بیوشیمیایی تخمک

تاکنون پژوهش‌های مختلفی در زمینه‌ی تغییرات فیزیولوژیک، مرفولوژیک و بیوشیمیایی مرتبط با

ماندگاری تخمک در محوطه‌ی شکمی پس از اوولاسیون صورت گرفته است. برخی مطالعات تغییرات مرفولوژیک صورت گرفته در تخمک در طی دوره‌ی پس از اوولاسیون را مسئول بروز تلفات و کاهش بازماندگی در تخم‌ها می‌دانند (Sakai *et al*., 1975;Hirose *et al*., 1977; Escaffre and Billard, 1979). نتایج مطالعات فوق نشان می‌دهند که تخریب کورتیکال آلوولای[1] (حفره‌های کناری) که توسط آب فعال می‌گردد، در تخمک‌های فوق رسیده، مدت زمان بیشتری را نسبت به تخمک‌های تازه اووله شده به خود اختصاص می‌دهد. همچنین در طول دوره‌ای که تخمک‌ها فوق رسیده می‌شوند، یک سری تغییرات مرفولوژیک را از خود نشان می‌دهند. این تغییرات با تجمع و ترکیب قطرات چربی و مهاجرت حفره‌های کناری به سمت قطب حیوانی در قزل‌آلای رنگین‌کمان همراه است. در واقع انعقاد قطرات چربی نشان دهنده‌ی کیفیت پائین تخمک‌ها است (Nomura *et al*., 1974). در ماهی حوض، فوق رسیدگی با افزایش شفافیت تخمک‌ها، شکستگی در برخی نقاط کورتیکال آلووی و پراکندگی قطرات چربی در قطب حیوانی همراه است (Formacion *et al*., 1992). در حالی که در گونه‌ی *Prochilodus marggravii* تغییری در ساختار تخمک از جمله سوراخ میکروپیل در اثر فوق رسیدگی گزارش نشده است (Rizzo *et al*., 2003).

مطالعه‌ای که پیرامون مقایسه‌ی تخمک‌های رسیده و فوق رسیده در قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفته نشان می‌دهد که فوق رسیدگی در تخمک با تغییرات ذیل همراه می‌باشد (Craik and Harvey, 1984):

زمانی که نتایج به صورت مطلق عنوان شوند، افزایش در محتوای آب تخمک، افزایش در میزان چربی‌های آزاد، آهن و کلسیم و کاهش در میزان چربی‌های غیرآزاد (باند شده)، پروتئین رسوب، فسفوپروتئین، لیپوپروتئین، چربی کل و وزن کوریون مشاهده می‌گردد. زمانی که نتایج به صورت نسبی عنوان شوند، افزایش در محتوای آب تخمک، چربی‌های آزاد، آهن و کلسیم، چربی کل و وزن کوریون و کاهش در میزان چربی‌های غیرآزاد (باند شده)، پروتئین رسوب، فسفوپروتئین و لیپوپروتئین دیده می‌شود (Craik and Harvey, 1984).

تخمک‌های فوق رسیده در ماهی stickle back بزرگتر بوده و محتوای آبی بیشتری را دارا هستند (Lam *et al*., 1978) در شگ ماهیان نیز فوق رسیدگی و کاهش بقاء تخم‌ها مربوط به تجزیه‌ی زرده، کاهش وزن خشک، افزایش محتوای آب و کاهش پروتئین رسوب می‌باشد (Schreck and Moyle, 1990).

[1] - Cortical alveoli

مطالعه‌ای که پیرامون فاکتورهای مشخص کننده‌ی حالت فوق رسیدگی تخمک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفته نشان می‌دهد که در حین فوق رسیدگی، وزن تر تخمک‌های آب نکشیده افزایش می‌یابد. همچنین وزن تخمک‌ها در حین آبکشی نیز زیاد شده و سطوح اسیدهای چرب استری شده و غیراستری شده به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد. اما وزن خشک هر تخمک، وزن تر تخمک‌های آب کشیده، مقدار پروتئین، فعالیت آنزیم‌های مالات دهیدروژناز، اسید فسفاتاز، آسپارتات آمینوترانسفراز و ایزوسیترات دهیدروژناز و همچنین فعالیت تنفسی تخمک تغییر نمی‌کند (Lahnsteiner, 2000).

در تخمک‌هایی که به تازگی اوله می‌شوند، زرده شامل یک توده‌ی همگن بوده و فضای پری‌ویتلین کوچک می‌باشد. لیکن، در تخمک‌های فوق رسیده، زرده غیرهمگن بوده و با وزیکول‌های متجمع زیاد و ساختارهای فیبر مانند همراه می‌باشد. همچنین فضای پری‌ویتلین نیز در این تخمک‌ها افزایش می‌یابد. زمانی که تخمک‌های تازه اوله شده در آب قرار گیرند، عمل ارتجاع کورتیکال وزیکول‌ها در طی پنج دقیقه آشکار می‌گردد، در حالی که در تخمک‌های فوق رسیده، سختی ناشی از آب کشیدگی مشاهده نشده و عمق فضای پری‌ویتلین خیلی نامنظم می‌باشد (Lahnsteiner, 2000). با گذر زمان پس از اوولاسیون، به تدریج قطرات چربی در تخمک‌ها ظاهر شده و به صورت لکه‌هایی خود را نشان می‌دهند (Azuma *et al.*, 2003).

در تخمک‌های نرمال، تجزیه‌ی پروتئین‌های زرده به شدت تحت کنترل آنزیم‌های ویژه ممانعت‌کننده‌ی پروته‌آز می‌باشد. در مقابل می‌توان انتظار داشت که فعالیت‌های پروتئولیتیک در تخمک‌های دارای کیفیت پایین افزایش یابد. مثلاً در ماهی Sea bass فعالیت آنزیمی کتپسین D در تخمک‌های با کیفیت پایین بسیار بیشتر از فعالیت این آنزیم در تخمک‌های با کیفیت بالا می‌باشد. بنابراین می‌توان کتپسین D را به عنوان یک اندیکاتور و نشانه‌ی قابل قبول برای کیفیت پایین تخمک‌ها در نظر داشت. این مسأله در ماهی Sea bream نیز نشان داده شده است (Rime *et al.*, 2004).

کاهش مقدار ATP تخمک در دوره‌ی پس از اوولاسیون در ماهی کپور معمولی توسط Boulekbache *et al.*, (1989) به اثبات رسید. این امر موجب کاهش انرژی قابل دسترس شده و در نتیجه تقسیم سلولی و بخش‌بندی کروموزوم‌ها را تغییر می‌دهد. باقی ماندن تخمک در محوطه‌ی شکمی مولدین ماده‌ی قزل‌آلای رنگین‌کمان تأثیری بر میزان ATP موجود در تخمک نداشته و سطح ATP ثابت باقی می‌ماند. ثبات مقدار ATP تخمک تا ١٤ روز پس از اوولاسیون ادامه دارد. لیکن، به تدریج تا روز ٢١ پس از اوولاسیون مقدار ATP کاهش می‌یابد. مقدار ATP اندازه‌گیری شده در تخمک ماهی قزل‌آلای

رنگین‌کمان حدود ۱۰۰ برابر بیش از آنچه که در تخمک کپور معمولی اندازه‌گیری شده است، می‌باشد (Aegerter and Jalabert, 2004). در ماهی Chinook salmon نیز نتایجی مشابه قزل‌آلای رنگین‌کمان به دست آمده است (Wending *et al.*, 2000).

وجود غلظت‌های بالای ATP در آزادماهیان در مقایسه با سایر ماهیان، نشان می‌دهد که ATP در آنها، به عنوان یک فاکتور محدود کننده در طی دوره‌ی پس از اوولاسیون مطرح نمی‌باشد (Aegerter and Jalabert, 2004).

۱-۹- اثرات باقی ماندن تخمک پس از اوولاسیون در محوطه‌ی شکمی بر ترکیب مایع تخمدانی

pH -۱-۹-۱

در طی باقی ماندن تخمک در محوطه‌ی شکمی و پس از اوولاسیون، pH مایع سلومیک به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد (Lahnsteiner, 2000). کاهش pH مایع سلومیک با گذشتن زمان پس از اوولاسیون در هر دو دمای ۱۲°C و ۱۷°C نشان داده شده است. این کاهش، در دمای ۱۷°C نسبت به دمای ۱۲°C سریع‌تر اتفاق می‌افتد (Aegerter and Jalabert, 2004). نتایج فوق‌الذکر با مشاهدات Rime *et al.*, (2004) مبنی بر کاهش قابل ملاحظه‌ی pH مایع سلومیک از ۸/۱ در روز اوولاسیون به ۷/۹ در روز ۲۱ پس از اوولاسیون که در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفت، تطابق دارد. لیکن، فاصله‌ی زمانی بین استحصال مایع سلومیک و اندازه‌گیری pH آن، همچنین درجه‌ی حرارت در طول این دوره، بایستی مد نظر قرار گیرد. تماس با هوا نیز تأثیرگذار خواهد بود. در مطالعه‌ی Aegerter and Jalabert, (2004) زمانی که درجه‌ی حرارت افزایش یافت و زمان اندازه‌گیری به تأخیر افتاد، در همان نمونه، تغییر در میزان pH به میزان بیش از ۰/۵ واحد مشاهده گردید.

۱-۹-۲- اسمولالیته

باقی ماندن تخمک در محوطه‌ی شکمی، پس از اوولاسیون، موجب کاهش قابل توجه اسمولالیته‌ی مایع سلومیک می‌گردد. با افزایش دما از ۱۲°C به ۱۷°C این کاهش سریع‌تر اتفاق می‌افتد.

اسمولالیته‌ی پایین مایع سلومیک، ممکن است به دلیل ورود آب به محوطه‌ی شکمی از طریق افزایش

قطر منفذ تناسلی پس از رهاسازی مکرر تخمک‌ها بوده و یا به دلیل تغییر در ترشحات تخمدانی باشد. بنابراین، اسمولالیته‌ی پایین مایع تخمدانی می‌تواند یک اندیکاتور و نشانه‌ی خوب برای کیفیت پایین تخمک‌ها باشد (Aegerter and Jalabert, 2004).

۱-۹-۳- غلظت پروتئین‌ها

با گذر زمان و باقی ماندن تخمک در محوطه‌ی شکمی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از اوولاسیون، میزان پروتئین‌های مایع سلومیک به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد (Lahnsteiner, 2000).

تقریباً حدود ۲۰۰ ذره پروتئین در نمونه‌های مربوط به مایع سلومیک قزل‌آلای رنگین‌کمان یافت شده است. تعداد ذرات پروتئینی در دوره‌ی پس از اوولاسیون، به تدریج افزایش یافته و حدود ۲۰ ذره پروتئینی، ما بین زمان اوولاسیون و سه هفته پس از آن ظاهر می‌شوند. به ویژه ۸ ذره پروتئینی در دوره‌ی پس از اوولاسیون ظاهر می‌گردند، به طوری که فراوانی آنها بین ۷ و ۲۱ روز پس از اوولاسیون به میزان ۲۶۰٪ و گاهی تا ۵۰۰٪ افزایش می‌یابد. در حقیقت، نشان داده شده است که پروتئین‌هایی که در زمان اوولاسیون در مایع سلومیک وجود نداشته و یا به میزان بسیار اندکی وجود دارند، در طی دوره‌ی پس از اوولاسیون در مایع تخمدانی ظاهر می‌گردند. مشاهدات نشان می‌دهند که زمان پس از اوولاسیون با تراوش برخی از ترکیبات تخمک به مایع سلومیک همراه است. به طوری که، قطعات ویتلوژنین که از تخمک‌های اوولـه‌ی نگهداری شده در مایع سلومیک منشاء گرفته‌اند، در طی دوره‌ی پس از اوولاسیون در مایع تخمدانی تجمع می‌یابند (Rime *et al*., 2004).

بنابراین، هر چه مدت زمان باقی ماندن تخمک‌ها در مایع سلومیک و در محوطه‌ی شکمی پس از اوولاسیون افزایش یابد، امکان افزایش غلظت برخی پروتئین‌ها افزون می‌گردد. همچنین ممکن است ظهور تدریجی برخی از ذرات پروتئینی در مایع سلومیک پس از اوولاسیون، ناشی از ضعیف شدن غشاء سلولی باشد که اجازه‌ی تراوش ذرات پروتئینی کوچک را داده و به عنوان اولین شواهد برای کیفیت پایین‌تر تخمک‌ها می‌باشند (Lahnsteiner, 2000).

به علاوه، تجمع تدریجی برخی از این پروتئین‌ها در مایع سلومیک، ممکن است اجازه دهد تا از آنها به عنوان نشانه‌هایی برای تخریب کیفیت تخمک‌ها و به خصوص در مواقعی که زمان دقیق اوولاسیون و پس از آن مشخص نمی‌باشد، استفاده نمود. در حقیقت سطوح (میزان) چنین قطعات پروتئینی در مایع سلومیک، می‌تواند به صورت یک اندیکاتور و نشانگر مفید برای تعیین کیفیت تخمک‌ها در قزل‌آلای رنگین‌کمان و

احتمالاً سایر آزادماهیان باشد (Rime *et al*., 2004).

Aegerter and Jalabert (2004) در مطالعه‌ی خود نشان دادند که در طی زمان پس از اوولاسیون، غلظت پروتئین مایع سلومیک به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد. مطالعه‌ی آنها در دو دمای $^{\circ}C$ ۱۲ و $^{\circ}C$ ۱۷ صورت گرفت. در روزهای ابتدایی پس از اوولاسیون غلظت پروتئین در هر دو دما تقریباً یکسان بوده، لیکن با گذر زمان پس از اوولاسیون افزایش غلظت پروتئین در دمای $^{\circ}C$ ۱۷ بیشتر از افزایش آن در دمای $^{\circ}C$ ۱۲ بود.

تغییرات ایجاد شده در مایع سلومیک ماهیان قزل‌آلایی که تنها یک بار تخم‌کشی می‌گردند، مشابه همان ماهیانی است که چندین بار تخم‌کشی می‌شوند (Lahnsteiner, 2000). بنابراین، افزایش غلظت مایع سلومیک در دوره‌ی پس از اوولاسیون بیشتر به دلیل تغییر در فعالیت‌های ترشحی تخمدان است تا به دلیل صدمه‌ی تخمک‌ها در تخم‌کشی‌های متوالی و دستکاری ماهیان. در هر حال افزایش غلظت مایع سلومیک با افزایش مدت زمان پس از اوولاسیون کاملاً مرتبط می‌باشد (Aegerter and Jalabert, 2004).

۱-۹-٤- غلظت چربی‌ها

با گذر زمان پس از اوولاسیون و باقی ماندن تخمک‌ها در محوطه‌ی شکمی قزل‌آلای رنگین‌کمان میزان اسیدهای چرب استری شده و غیراستری شده در مایع سلومیک، به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد. همچنین در طول فوق رسیدگی تخمک این گونه هیچ تغییری در نوع ترکیبات چربی تخمک یافت نشد. فسفاتیدیل کولین و تری‌گلیسیرید انواع اصلی چربی‌ها بوده و کلسترول و اسیدهای چرب آزاد در مقادیر کمتر یافت شدند (Lahnsteiner, 2000).

۱-۹-۵- فعالیت‌های آنزیمی

در طی دوره‌ی پس از اوولاسیون، در قزل‌آلای رنگین‌کمان فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و اسید فسفاتاز به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد (Lahnsteiner, 2000). سنجش‌های آنزیمی صورت گرفته، فعالیت آنزیم‌های کلاژناز، ژلاتیناز و لاکتات دهیدروژناز را مشخص می‌نمایند (Rime *et al*., 2004).

فصل دوم

مرور بر منـابع

– Sakai *et al.*, (1975) نشان دادند، که باقی ماندن تخمک‌ها به مدت ۵ الی ۷ روز پس از اوولاسیون در محوطه‌ی شکمی مولدین ماده‌ی قزل‌آلای رنگین‌کمان، موجب کاهش بقاء جنین‌ها و لاروها گردید. در این مطالعه که در دمای $^{\circ}C$ ۱۳ صورت گرفت، آنها دریافتند که پس از ۱۵ روز، میزان درصد لقاح بسیار کاهش یافته و حتی نزدیک به صفر می‌رسد. همچنین، درصد آلوین‌های ناهنجار و ضعیف، در تخمک‌هایی که به مدت بیشتری در مایع سلومیک باقی ماندند، بیشتر بود.

– در مطالعه‌ی Escaffre and Billard (1979) که بر روی گونه‌ی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفت، نشان داده شد که بقاء تخم‌ها در مورد تخمک‌های استحصال شده به مدت ۸ و ۱۵ روز پس از اوولاسیون، بیش از ۹۰٪ بوده است. این مطالعه در دمای متغیر $^{\circ}C$ ۱۳-۶/۵ صورت پذیرفت. این افراد، همچنین نشان دادند که بقاء تخمک‌هایی که در زمان‌های مختلف پس از اوولاسیون از ماهی مولد ماده اخذ می‌گردند، به نوع گونه و نژاد آن بستگی دارد.

– Bry (1981) نشان داد، که درصد چشم‌زدگی تخم‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، برای تخمک‌های استحصال شده به مدت ۹ روز پس از اوولاسیون، به میزان قابل توجهی کاهش یافت. لازم به ذکر است که دما در این مطالعه $^{\circ}C$ ۱۳ بوده است.

– Mollah and Tan (1983) نشان دادند که بقاء تخمک‌هایی که در زمان‌های مختلف پس از اوولاسیون از ماهی مولد ماده اخذ می‌گردند، به نوع گونه و نژاد آن بستگی دارد.

– مطالعه‌ی Craik and Harvey (1984) بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که فوق رسیدگی با تغییرات زیر همراه است؛ افزایش مقدار آب، چربی‌های آزاد، کلسیم و آهن و کاهش چربی‌های غیر آزاد، چربی کل و وزن کوریون تخمک.

– مطالعه‌ی Springate *et al.*, (1984) نشان داد، که باقی ماندن تخمک در محوطه‌ی شکمی مولدین ماده‌ی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از اوولاسیون، بر مراحل مختلف رشد جنین تأثیرگذار بوده و موجب تلفات بعدی می‌گردد. در مطالعه‌ی آنها که در دمای $^{\circ}C$ ۱۰ صورت پذیرفت، مناسب‌ترین زمان، جهت تخم‌کشی از مولدین، ٤ الی ٦ روز پس از اوولاسیون معرفی گردید. درصد چشم‌زدگی از ۷۸٪ در روز اوولاسیون، به ۱۰۰٪ در ٤ الی ٦ روز پس از اوولاسیون افزایش یافته و سپس به ٥٦٪ در روز بیستم پس از اوولاسیون کاهش یافت. درصد تفریخ تخم‌ها نیز از ۷٦٪ در روز اوولاسیون، به ۹٦٪ در روز ٤ الی ٦ پس از اوولاسیون افزایش یافته و سپس در روز بیستم پس از اوولاسیون به ٤۸٪ تقلیل یافت.

– Yamazaki *et al.*, (1989) در مطالعه خود افزایش ناهنجاری‌های جنینی را برای ماهی قزل‌آلای

رنگین‌کمان، به خصوص در ۱٤ روز پس از اوولاسیون، گزارش نمودند.

– مطالعه‌ی Formacion *et al.*, (1992) بر روی فوق رسیدگی تخمک در ماهی حوض نشان داد که تخمک‌ها در طول مدت ۲٤ ساعت پس از اوولاسیون فوق رسیده می‌شوند. فوق رسیدگی با افزایش شفافیت تخمک‌ها، شکستگی در برخی نقاط کورتیکال آلوولای و پراکندگی قطرات چربی در قطب حیوانی همراه است.

– مطالعه Fauvel *et al.*, (1993) نشان داد که در گونه‌ی Turbot، pH مایع تخمدانی در زمان اوولاسیون ۸/۱ است که این مقدار در زمان فوق رسیدگی به ۷/۱ کاهش می‌یابد. همچنین بین pH مایع تخمدانی و درصد باروری رابطه‌ی نزدیکی وجود دارد.

– مطالعه‌ی Gaudemar and Beall (1998) نشان داد که در ماهی آزاد اقیانوس اطلس فوق رسیدگی، تأثیر منفی بر بقاء تخم‌ها دارد. آنها مشاهده نمودند که درصد تخمک‌های لقاح نیافته، تلفات تخم‌ها و میزان ناهنجاری لاروها، با افزایش فاصله‌ی زمانی ما بین اوولاسیون و تخم‌کشی، افزایش یافت. به طوری که، در ماهیان ماده‌ای که تخمک‌های آنها به تازگی اووله شده بود، ۱٦/۷٪ تخم‌ها از بین رفتند، ۳/۱٪ تخم‌ها لقاح نیافتند و ۱/۷٪ ناهنجاری دیده شد. این ارقام برای ماهیان ماده‌ای که حداقل مدت یک هفته از تاریخ اوولاسیون تخمک‌ها در آنها گذشته بود، به ترتیب ۲۵/٤٪، ۹/۷٪ و ۵/٤٪ بود. لازم به ذکر است که دمای مطالعه $9^{\circ}C$ بوده است. در هر حال، تأثیر منفی باقی ماندن تخمک‌ها در محوطه ی شکمی مولدین ماده پس از اوولاسیون، بر هر دو مرحله‌ی چشم‌زدگی و تفریخ اثبات گردیده است. در مطالعه‌ی فوق‌الذکر، تنها گذشت ۸ روز پس از اوولاسیون، موجب پایین آمدن درصد لقاح و افزایش تلفات تخم‌ها و میزان ناهنجاری‌ها گردید.

– مطالعه‌ی Lahnsteiner (2000) نشان داد که باقی ماندن تخمک‌ها در محوطه‌ی شکمی مولدین ماده‌ی قزل‌آلای رنگین‌کمان، پس از اوولاسیون، بقاء تخم‌ها را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد. به طوری که این رقم از ۸۵٪ در تخمک‌های تازه اووله شده به ۲۵٪ در تخمک‌هایی که به مدت سه هفته در محوطه‌ی شکمی مولدین ماده باقی مانده بودند، رسید. همچنین او نشان داد که بقاء تخم در تخمک‌های تازه اووله شده و فوق رسیده به طور قابل ملاحظه‌ای با پارامترهای مربوط به مایع سلومیک در ارتباط است.

– مطالعه‌ی Lahnsteiner *et al.*, (2000) نشان داد که در کپور معمولی، کپور نقره‌ای، کپور علفخوار و ماهی Bleak، رابطه‌ی قابل توجهی بین درصد لقاح و وزن تخم آب کشیده و pH مایع تخمدانی، همچنین مقدار پروتئین و فعالیت آسپارتات آمینوترانسفراز برقرار است. اما مقدار پروتئین، پپتیدها، فروکتور،

گالاکتوز، گلوکز و اسیدهای چرب استری شده و غیر استری شده و مجموع DNA و RNA تخمک با میزان لقاح آنها ارتباطی ندارند.

– مطالعه‌ی Azuma *et al.*, (2003) که بر روی گونه‌ی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفت، نشان داد که پیشرفت تقسیمات سلولی و مراحل توسعه‌ی جنینی پس از لقاح، با افزایش زمان ماندگاری تخمک در مایع سلومیک، کندتر و آهسته‌تر شده و زمان بیشتری را به خود اختصاص می‌دهد. این امر، با شمارش تعداد بلاستومرها به مدت ۱۵ ساعت بعد از لقاح، مشخص گردید. در واقع، کاهش تعداد بلاستومرها، در تخمک‌هایی که به مدت ۱۰ روز و یا بیشتر در مایع سلومیک نگهداری شده بودند، مشاهده گردید. این پدیده خاطرنشان می‌سازد که پیشرفت مراحل جنینی با گذشتن سن تخمک ها (افزایش باقی ماندن آنها در مایع سلومیک پس از اوولاسیون) کاهش می‌یابد. این مطالعه، همچنین نشان داد که تخمک‌هایی که به مدت طولانی‌تری در مایع سلومیک باقی ماندند، یک کاهش تدریجی را در میزان درصد چشم‌زدگی و تفریخ نشان دادند. در این مطالعه، که در دمای $^{\circ}C$ ۱۰ صورت گرفت، میانگین درصد لقاح، برای تخمک‌های استحصال شده به مدت ۱٤ روز پس از اوولاسیون، به ۳۵/۵٪ رسید.

– در مطالعه‌ی Bonnet *et al.*, (2003) که در دمای $^{\circ}c$ ۱۲ صورت گرفت، درصد چشم‌زدگی برای تخمک‌های استحصال شده به مدت ۹ روز پس از اوولاسیون بیش از ۹۰٪ بوده است.

– در مطالعه‌ای که توسط Rizzo *et al.*, (2003) بر روی گونه *Prochilodus marggravii* انجام شد، تاثیر باقی ماندن تخمک پس از اوولاسیون در حفره تخمدانی و خارج از آن در دو دمای $^{\circ}C$ ۱۸ و $^{\circ}C$ ۲٦ مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه آنها نشان داد که باقی ماندن تخمک‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۱۸ و $^{\circ}C$ ۲٦ در داخل تخمدان سبب می‌شود درصد لقاح نسبت به گروه کنترل ۳۰ درصد کاهش یابد. این مقدار در مدت ٦۰ دقیقه به ۵۰ درصد و ۱۲۰ دقیقه به بیش از ۹۰ درصد می‌رسد. همچنین ساختار تخمک در طول ۲ ساعت نگهداری تخمک‌ها حفظ شد و سوراخ میکروپیل همچنان باز ماند.

– مطالعه‌ی Aegerter and Jalabert (2004) نشان داد که به طور کلی، با افزایش زمان ماندگاری تخمک‌ها در محوطه‌ی شکمی پس از اوولاسیون، نرخ بقاء کاهش یافته و میزان ناهنجاری‌ها افزایش می‌یابد. همچنین با افزایش زمان ماندگاری تخمک‌ها، ایجاد حالت تریپلوئیدی به میزان زیادی و گاهی تا ۵۰٪ افزایش می‌یابد.

زمانی که مولدین ماده در دمای $^{\circ}C$ ۱۲ نگهداری شدند، درصد لقاح، چشم‌زدگی و تفریخ برای نمونه‌های تخمکی که صفر و ۷ روز پس از اوولاسیون استحصال گردیدند، به صورت ثابت باقی مانده و پس از آن به

میزان قابل توجهی کاهش یافت. زمانی که مولدین ماده در دمای $^{\circ}C$ ۱۷ نگهداری شدند، نرخ بقاء جنین‌ها، بین نمونه‌های تخمک استحصالی در روزهای صفر و ۷ پس از اوولاسیون به میزان قابل توجهی کاهش یافت و جنین‌هایی که از تخمک‌های استحصالی ۱٤ روز پس از اوولاسیون به وجود آمدند، مدت زیادی زنده نماندند. بقاء تخم‌ها در همه‌ی مراحل برای مولدینی که در دمای $^{\circ}C$ ۱۷ نگهداری شدند، کمتر از بقاء تخم‌های مولدینی بود که در دمای $^{\circ}C$ ۱۲ نگهداری گردیدند. به جز درصد چشم‌زدگی در روز اوولاسیون برای هر دو دما که تفاوت آنها معنی‌دار نبود.

درصد آلوین‌های ناهنجار، به میزان قابل توجهی تنها یک هفته پس از تاریخ اوولاسیون در دمای $^{\circ}C$ ۱۲ افزایش یافت و در بین روزهای ۷ و ۱٤ پس از اوولاسیون ثابت مانده و پس از آن به میزان قابل توجهی کاهش یافت. در دمای $^{\circ}C$ ۱۷، درصد آلوین‌های ناهنجار به میزان زیادی ما بین روزهای ۰ و ۷ پس از اوولاسیون کاهش یافته و به پایین‌تر از آنچه در $^{\circ}C$ ۱۲ بود نیز رسید.

زمانی که تخمک‌ها در روز اوولاسیون از مولدین نگهداری شده در دمای $^{\circ}C$ ۱۲ استحصال گردیدند، هیچ گونه لارو تریپلوئیدی حاصل نگردید. لیکن، با گذر زمان و در مورد تخمک‌های استحصالی در روزهای ۷، ۱٤ و ۲۱ پس از اوولاسیون، به تدریج تعداد لاروهای تریپلوئید افزایش یافت. در مورد مولدینی که در دمای $^{\circ}C$ ۱۷ نگهداری شدند، این میزان بیشتر بوده و در همان روز اوولاسیون به ۱۷٪ رسید.

– Rime *et al.*, (2004) نشان دادند که باقی ماندن تخمک در محوطه‌ی شکمی قزل‌آلای رنگین کمان که ممکن است به مدت ۲ الی ۳ هفته به طول بیانجامد، با کاهش تدریجی بقاء تخم‌ها همراه است. همچنین، این امر با افزایش ایجاد ناهنجاری‌های مرفولوژیک همراه خواهد بود. اعتقاد بر آن است که ترکیبات موجود در مایع سلومیک، برای حفظ قابلیت لقاح تخمک‌ها مهم هستند. به طوری که، نگهداری تخمک‌ها در مایع سلومیک مصنوعی با pH و فشار اسمزی مشابه مایع تخمدانی ماهی، موجب کاهش سریع قابلیت لقاح و توسعه مراحل بعدی می‌گردد. در مطالعه‌ی اخیرالذکر که در دمای $^{\circ}C$ ۱۲ صورت گرفت، نرخ بازماندگی تخم‌ها از ۷۰٪ در روز ۷ به ۳۰٪ در روز ۱٤ تقلیل یافت.

– مطالعه‌ی Lahnsteiner and Patarnello (2004) بر روی Sea bream نشان داد که می‌توان از مقدار آنزیم‌های اسیدفسفاتاز، ادنیلات کیناز، گلوکز ٦– فسفات و سطوح اسیدهای آمینه، مونوساکاریدها و سیالیک اسید به عنوان نشانگر جهت پیش‌بینی کیفیت تخمک‌ها استفاده کرد.

– مطالعه Mohagheghi Samarin *et al.*, (2008) بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که درصد چشم‌زدگی و تفریخ تا ۳ روز پس از اوولاسیون پایین بوده اما از روز ششم پس از اوولاسیون شروع به

افزایش نمود. این مقدار در ۹ روز پس از اوولاسیون به حداکثر رسید. آنها همچنین نشان دادند که با افزایش دما از $^{\circ}C$۲ به $^{\circ}C$۸ حداکثر زمان استحصال تخمک‌های با کیفیت مناسب از ۳ هفته به ۲ هفته کاهش می‌یابد.

– مطالعات مختلف بر روی قزل‌آلای رنگین کمان نشان می‌دهند که باقی ماندن تخمک‌ها پس از اوولاسیون در محوطه شکمی مولدین سبب افت کیفیت تخمک‌ها می‌شود. زمان کاهش کیفیت تخمک‌ها با توجه به دمای مطالعه متفاوت است به طوری که در دمای $^{\circ}C$۱۳، ۷–۵ روز پس از اوولاسیون (Sakai *et al*., 1975)، در دمای $^{\circ}C$۱۰، ۳ هفته پس از اوولاسیون (Springate *et al*., 1984)، $^{\circ}C$۱۷، ۱ هفته پس از اوولاسیون (Aegerter and Jalabert, 2004)، $^{\circ}C$۸، ۲ هفته پس از اوولاسیون و $^{\circ}C$۲، ۳ هفته پس از اوولاسیون (Mohagheghi Samarin *et al*., 2008) گزارش شده است. همچنین با افزایش باقی ماندن تخمک‌ها در حفره سلومیک پس از اوولاسیون، پیشرفت مراحل جنینی کاهش یافته و با روند کندی صورت می‌گیرد (Azuma *et al*., 2003). فوق رسیدگی در تخمک با افزایش مقدار آب، چربی‌های آزاد، کلسیم و آهن (Craik and Harvey, 1984)، اسیدهای چرب استری شده و غیر استری شده (Lahnsteiner, 2000) و کاهش چربی‌های غیر آزاد، چربی کل و وزن کوریون تخمک (Craik and Harvey, 1984) همراه است. همچنین فوق رسیدگی با افزایش مقدار پروتئین، فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز و اسید فسفاتاز (Lahnsteiner, 2000)، کاهش pH و اسمولالیته (Lahnsteiner, 2000, Rime *et al*., 2004, Aegerter and Jalabert, 2004) مایع تخمدانی همراه است که به دلیل رابطه بسیار معنی‌دار آنها با کیفیت تخمک می‌توانند به عنوان نشانگرهای کیفیت تخمک مطرح باشند.در ماهی آزاد اقیانوس اطلس، در دمای $^{\circ}C$۹ تنها گذشت ۸ روز پس از اوولاسیون موجب پایین آمدن کیفیت تخمک گردید (Gaudemar and Beall, 1998)

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۳-۱- زمان و مکان انجام پروژه

این پروژه در پاییز و زمستان سال ۱۳۸٦ در مرکز تکثیر و پرورش آزادماهیان شهید باهنر انجام شد. این مرکز در محله‌ی رودبارک از منطقه‌ی کلاردشت در غرب استان مازندران، واقع است. مرکز شهید باهنر، دولتی و متعلق به سازمان شیلات ایران بوده و از امکانات گسترده‌ای در زمینه‌ی تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی، در سطح خاورمیانه برخوردار است. فعالیت‌های عمده‌ی مرکز، بر روی گونه‌ی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)، متمرکز می‌باشد.

جدول ۳-۱: برخی از مشخصات مرکز تکثیر و پرورش آزادماهیان شهید باهنر

مکان	محله‌ی رودبارک از منطقه‌ی کلاردشت در استان مازندران
سال تأسیس	۱۳٦۲
تعداد پرسنل	٤٤ نفر
منبع آب ورودی	رودخانه و چشمه
دبی آب ورودی	۵۰۰-۳۵۰ لیتر در ثانیه (با توجه به تغییرات فصلی)
تعداد استخرهای نگهداری مولدین در بخش آزاد	۹ عدد استخر مستطیلی با مساحت کل ۳۲٤ متر مربع
تعداد تراف‌ها در بخش آزاد	٦۲ عدد
میزان تولید سالانه در بخش آزاد	۳۰۰/۰۰۰ عدد بچه ماهی اسمولت

۳-۲- شرایط فیزیکی و شیمیایی آب و حوضچه‌های نگهداری مولدین

جمعیت مولدین، در حوضچه‌های سیمانی مربع شکل با ابعاد ۲×۲ متر و ارتفاع ۱ متر نگهداری شدند. کلیه حوضچه‌ها دارای ورودی و خروجی مستقل بوده و آب مورد نیاز آنها از رودخانه و چشمه تأمین‌گردید. کیفیت شیمیایی آب مذکور، با اکسیژن محلول در حد اشباع و pH=۷/۵ متناسب با استانداردهای مربوط به ماهیان سردآبی بوده و درجه حرارت در طی دوره آزمایش ۰/٦±۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد.

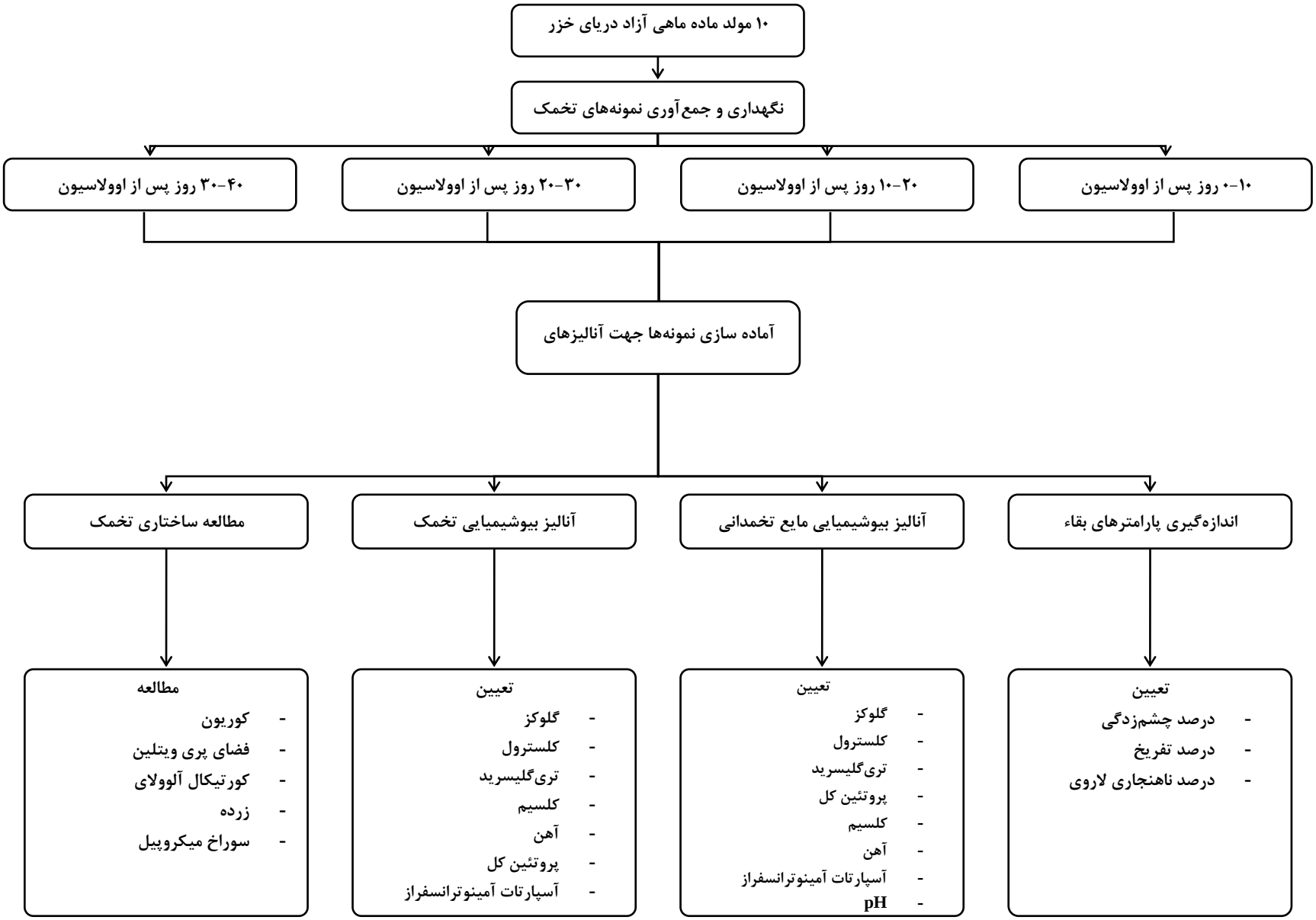
۳-۳- مشخصات مولدین

مولدین ماده‌ی پرورشی چهار ساله ماهی آزاد دریای خزر با میانگین وزن ٦۹/٦۸±٤۵۲/۷۷ گرم و طول ۲/٦٦±۳۷/٦۲ سانتی‌متر، در اولین سال تخم‌دهی استفاده شدند.

۳-٤- انتخاب مولدین

در این تحقیق ۱۰ عدد مولد ماده‌ی پرورشی ماهی آزاد دریای خزر به عنوان ۱۰ تکرار آزمایشی در نظر گرفته شدند و از هر یک، در چهار نوبت، (چهار تیمار آزمایشی) با فواصل زمانی ۱۰ روز تخم‌کشی صورت گرفت (Lahnsteiner, 2000). شکل ۳-۱ شمای کلی نحوه آماده سازی نمونه‌ها را نشان می‌دهد.

در ابتدا کلیه‌ی مولدین موجود در یک جمعیت همگن اولیه، در محلول ۱۰۰ppm از ماده‌ی بیهوش کننده‌ی MS222 بیهوش شده و سپس مورد معاینه قرار گرفتند تا از عدم حصول رسیدگی جنسی نهایی در آنها اطمینان حاصل شود. عمل معاینه، از طریق اعمال فشار آرام به محوطه‌ی شکمی از طرف ناحیه‌ی سینه‌ای به سمت منفذ تناسلی صورت گرفت. با اعمال همین فشار آرام، تخمک‌ها از منفذ تناسلی مولدینی که رسیدگی جنسی نهایی و اوولاسیون تخمک‌ها در آنها صورت گرفته بود، خارج گردیدند. این مولدین، از جمعیت همگن اولیه خارج شده و بنابراین تنها به مولدینی که هنوز اوولاسیون تخمک‌ها در آنها اتفاق نیفتاده بود، اجازه داده شد تا در جمعیت باقی بمانند. پس از گذشت ۱۰ روز مجدداً همین جمعیت مورد معاینه قرار گرفت. بنابراین، می‌توان ادعا نمود که عمل اوولاسیون برای مولدینی که در معاینه‌ی اخیر اقدام به تخم‌دهی نمودند، در فاصله زمانی این ۱۰ روز صورت گرفته بود. از میان چنین مولدینی، تعداد ۱۰ عدد مولد ماده به طور تصادفی جدا شده و به سالن تکثیر انتقال یافتند.



شکل ۳-۱: شمای آماده سازی نمونه‌ها جهت مطالعه پارامترهای بقاء و پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تخمک و مایع تخمدانی

۳-۵- معاینه و تکثیر مولدین

عملیات تکثیر مصنوعی برای مولدین انتخاب شده در چهار نوبت در یک دوره چهل روزه به فاصله زمانی ۱۰ روز صورت گرفت. اولین نوبت تکثیر، که به عنوان اولین تیمار آزمایشی در نظر گرفته شد، در همان تاریخ معاینه دوم انجام شد و لذا مولدین، تا این زمان، تخمک‌ها را به مدت ۱۰-۰ روز پس از اوولاسیون در محوطه‌ی شکمی خود نگهداری نمودند. در نخستین نوبت تکثیر، پس از انتقال مولدین به سالن تکثیر و بیهوش نمودن آنها در محلول ppm ۱۰۰ از ماده‌ی بیهوش کننده‌ی MS222، طول و وزن مولدین مورد سنجش قرار گرفت. مقدار ۲۵ گرم تخمک (۱۳٦/۲۲±۵۰۰/۷ تخمک)، از هر مولد، استحصال شد و به بقیه تخمک ها اجازه داده شد تا ۱۰ روز بعد، یعنی دومین نوبت تکثیر، در محوطه‌ی شکمی مولدین باقی بمانند. مقدار تخمک استحصال شده از هر مولد ماده، در هر نوبت تکثیر، دقیقاً ۲۵ گرم بوده و با روش کاملاً مشابه لقاح یافتند. مایع سلومیک جدا شد، و نسبت ۲۵ گرم تخمک/۱cc اسپرم/۱۰cc آب برای لقاح به کار گرفته شد. اسپرم مورد استفاده برای هر یک از نوبت‌های تکثیر، از ۸ مولد نر استحصال شده و با نسبت مساوی به خوبی مخلوط گردید تا تکرارهای هر تیمار آزمایشی تا حد ممکن از کیفیت یکسان اسپرم، برخوردار باشند (تراکم اسپرماتوزوئید= $۲٤۸/۵۵\times۱۰^{٦}$ سلول در میلی لیتر). همچنین با توجه به زیاد بودن تعداد مولدین نر و مخلوط شدن اسپرم آنها، می‌توان ادعا نمود که تیمارهای آزمایشی نیز از کیفیت یکسان اسپرم، برخوردار گردیدند. تخم‌ها، بعد از لقاح و آبکشی، به سالن انکوباسیون انتقال یافتند تا پس از انجام عمل هم دمایی، در سینی‌های قسمت‌بندی شده سالن انکوباسیون جای گیرند. توضیح آنکه، به دلیل حجم کم تخم‌های لقاح یافته برای هر مولد و عدم نیاز به وجود یک سینی برای تخم‌های هر مولد، سینی‌ها قسمت‌بندی شدند. به این ترتیب که هر سینی به چهار قسمت مساوی تقسیم گردید، به طوری که، تیغه‌های جدا کننده در جهت جریان آب و به موازات یکدیگر قرار گرفته و اجازه‌ی ورود و خروج آب را فراهم آوردند.

جهت جلوگیری از اختلاط تخم‌ها، کلیه مولدین، ظروف تخم‌کشی و جایگاه قرارگیری تخم‌ها در سینی‌های سالن انکوباسیون، علامت‌گذاری شدند، به طوری که، بتوان تشخیص داد که تخم‌های هر بخش، مربوط به کدام مولد است.

چنان چه اشاره گردید، تنها ۲۵ گرم از تخمک‌های هر مولد، استحصال شده و به بقیه‌ی تخمک‌ها اجازه داده شد که تا مرحله‌ی دوم تکثیر، در محوطه‌ی شکمی مولدین باقی بمانند. فاصله‌ی زمانی مراحل تکثیر ۱۰ روز در نظر گرفته شد و در مرحله دوم تکثیر نیز مجدداً مقدار ۲۵ گرم تخمک از هر مولد ماده استحصال

گردید. بنابراین می‌توان ادعا نمود که این تخمک‌ها تا نوبت دوم تکثیر، به مدت ۲۰-۱۰ روز در محوطه‌ی شکمی مولدین باقی ماندند. عملیات تکثیر مصنوعی، لقاح و سایر مراحل، دقیقاً مانند آنچه که در نوبت اول تکثیر، صورت گرفته بود، انجام پذیرفت و تخم‌های مرحله دوم نیز در سینی‌های قسمت‌بندی شده‌ی سالن انکوباسیون جای گرفتند. به همین ترتیب، تخمک‌هایی که در نوبت سوم و چهارم تکثیر از مولدین استحصال گردیدند، تا زمان تکثیر به ترتیب به مدت ۳۰-۲۰ و ٤٠-۳۰ روز در محوطه‌ی شکمی باقی ماندند. عمل تکثیر مصنوعی برای این تخمک‌ها نیز عیناً مشابه نوبت اول و دوم تکثیر صورت گرفت.

۳-٦- مرحله‌ی انکوباسیون

در این تحقیق تخم‌ها تا مرحله‌ی چشم‌زدگی که در دمای $^{\circ}C$ ۰/۲±۷ سالن انکوباسیون، ۲۸-۲۵ روز طول کشید، در سینی‌های چشمه درشت و سرپوشیده‌ی سالن انکوباسیون نگهداری شده و پس از آن به سینی‌های چشمه ریز و سرپوشیده انتقال داده شدند تا لاروها پس از تفریخ (۵۵-۵۰ روز پس از لقاح)، از سینی‌ها خارج نشده و در همان جا باقی بمانند. همچنین، به منظور جلوگیری از ایجاد آلودگی‌های قارچی، تخم‌ها یک روز در میان و هر بار به مدت یک ساعت توسط مالاشیت گرین با غلظت ۱ppm شستشو داده شدند.

۳-۷- اندازه‌گیری پارامترهای کیفیت تخمک

در این تحقیق فاکتورهای اندازه‌گیری شده در طی دوره‌ی انکوباسیون، درصد چشم‌زدگی، درصد تفریخ و درصد ناهنجاری لاروی بودند که روش عمل و نحوه‌ی اندازه‌گیری هر یک از فاکتورهای فوق، به شرح ذیل می‌باشد.

۳-۷-۱- اندازه‌گیری درصد چشم‌زدگی

پس از انجام عملیات تکثیر مصنوعی و لقاح، تخم‌ها تا زمان ظهور لکه‌ی چشمی در سینی‌های چشمه درشت و سرپوشیده‌ی سالن انکوباسیون جای گرفتند.

بعد از نمایان شدن لکه‌ی چشمی، تخم‌ها از مرحله‌ی حساسیت خارج شده، و بنابراین دستکاری آنها مشکلی را ایجاد نخواهد نمود. در این هنگام، اندازه‌گیری درصد چشم‌زدگی امکان‌پذیر می‌باشد. جهت این امر، اعمال شوک فیزیکی برای تخم‌ها صورت گرفت. به این ترتیب که تخم‌های هر بخش از سینی‌ها به درون یک تشتک پر از آب، از ارتفاع ۳۰ سانتی‌متری سیفون شده و پس از چندین مرتبه شستشو برای

خارج شدن گل و رسوبات، این بار به سینی‌های چشمه ریز برگردانده شدند. با اعمال این شوک فیزیکی، تخم‌های چشم نزده کاملاً سفید شده و از تخم‌های چشم زده متمایز می‌گردند. جهت حصول اطمینان از سفید شدن همه تخم‌های چشم نزده، ۲٤ ساعت پس از شوک‌دهی، تخم‌های سفید، شمارش و خارج شده و تعداد آنها برای هر گروه ثبت گردید. بنابراین، با استفاده از رابطه ذیل، درصد چشم‌زدگی محاسبه شد:

۱۰۰× (تعداد کل تخم‌ها/ تعداد تخم‌های چشم‌زده)= درصد چشم‌زدگی

۳-۷-۲- اندازه‌گیری درصد تفریخ

چنانچه عنوان گردید، پس از جدا نمودن تلفات مرحله‌ی چشم‌زدگی، تخم‌های چشم زده به سینی‌های چشمه ریز انتقال یافتند تا لاروها پس از تفریخ در سینی باقی مانده و دقیقاً شمارش گردند. اگر تخم‌های چشم زده، در سینی‌های چشمه درشت باقی بمانند، لاروها پس از تفریخ، از شیارها و چشمه‌های سینی عبور کرده و به داخل تراف منتقل می شوند. لاروها در تراف مخلوط شده و بنابراین تنها از طریق شمارش تخم‌های تفریخ نشده که در سینی باقی می‌مانند، می‌توان درصد تفریخ را مشخص نمود. به همین دلیل، جهت محاسبه‌ی دقیق درصد تفریخ، تخم‌های چشم‌زده به سینی‌های چشمه ریز انتقال یافتند و بنابراین، لاروها پس از تفریخ، در همان بخش از سینی باقی ماندند. لذا امکان شمارش دقیق تعداد لاروها فراهم آمد. درصد تفریخ طبق رابطه ذیل برآورد گردید:

۱۰۰× (تعداد کل تخم‌ها/ تعداد لارو تفریخ شده)= درصد تفریخ

۳-۷-۳- اندازه‌گیری درصد ناهنجاری لاروی

در زمان تفریخ، پس از شمارش تعداد لاروهایی که ناهنجاری لاروی شامل کج شدن ستون فقرات و یا دم و همچنین انحنای بدن و یا سایر ناهنجاری‌های ریختی در آنها مشاهده می‌شد، درصد ناهنجاری لاروی طبق رابطه ذیل محاسبه گردید:

۱۰۰× (تعداد لاروهای تفریخ شده/ تعداد لارو ناهنجار)= درصد ناهنجاری لاروی

۳-۸- نمونه‌برداری و تعیین متابولیت‌ها و آنزیم تخمک و مایع تخمدانی

در هر تیمار آزمایشی، از هر مولد ماده ۵ گرم تخمک (۲۷/۳۸±۱۰۰ تخمک) و ۵cc مایع تخمدانی استحصال و در نیتروژن مایع منجمد شدند و تا زمان آنالیز در دمای $^{\circ}C$ ۲۰- نگهداری شدند. در آزمایشگاه

تخمک‌ها داخل هموژنایزر دستی ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه کاملاً هموژنایز شد و بدین ترتیب عصاره‌ی آن تهیه گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٤۰۰۰×g سانتریفوژ گردید و محلول فوقانی پس از رقیق سازی با فسفات بافر Sorensen (pH=۷/۳۸) (McPheron and Pincus, 2007) به نسبت ۱ به ۵ برای آنالیز استفاده شد. در تعیین پارامترهای بیوشیمیایی تخمک و مایع تخمدانی از روش فوتومتریک استفاده شد. همچنین کیت‌های آزمایشگاهی شرکت Merck آلمان برای آنالیز پارامترهای بیوشیمیایی تخمک و مایع تخمدانی استفاده شدند. کلسیم به روش Arsenazo (Bauer, 1981)؛ آهن به روش Ferrozine (Burtis and Ashwood, 1996)؛ فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز به روش IFCC (Bergmeyer *et al.*, 1986)؛ پروتئین کل به روش Biuret (Tietz, 1986)؛ کلسترول به روش CHOD-PAP (Artiss and Zak, 1997)؛ تری‌گلیسیرید به روش GPO (Tietz, 1986) و گلوکز به روش Glucose Oxidase (Burtis and Ashwood, 1996) اندازه‌گیری شد.

۳-۸-۱- اندازه‌گیری کلسیم به روش Arsenazo

اساس آزمایش:

آرسنازو از نظر شیمیایی با ثبات بوده و در pH خنثی روی یون کلسیم اختصاصی عمل می‌کند. در این روش آرسنازو با یون کلسیم تشکیل کمپلکس ارغوانی رنگ می‌نماید که جذبی در ٦۵۰ نانومتر دارد. شدت جذب متناسب با کلسیم موجود در نمونه می‌باشد (Bauer, 1981).

روش آزمایش:

پارامترهای لازم:

حرارت: ثابت آزمایشگاه — حجم معرف: ۱ میلی‌لیتر

طول موج: ٦٦۰-٦۰۰ نانومتر — حجم نمونه: ۱۰ میکرولیتر

میکروکووت: از نوع Drain Cell — اندازه‌گیری: خواندن مقابل بلانک معرف

جدول ۳-۲: دستورالعمل تنظیم دستگاه اتوآنالایزر جهت اندازه‌گیری مقدار کلسیم (Bauer, 1981)

	نمونه	استاندارد	بلانک معرف
RGT 1	**۱ میلی‌لیتر**	**۱ میلی‌لیتر**	**۱ میلی‌لیتر**
نمونه مورد آزمایش	**۱۰ میکرولیتر**	–	–
استاندارد RGT 2	–	**۱۰ میکرولیتر**	

آب مقطر	–	–	**۱۰ میکرولیتر**
پس از ۵ دقیقه در حرارت آزمایشگاه جذب تست و استاندارد را در ٦٦٠ نانومتر مقابل بلانک معرف قرائت نمایید (ثبات رنگ ۳۰ دقیقه است)			
RGT=Arsenazo Reagent			

محاسبه:

معادله (۳-۱)

$$\text{کلسیم (mg/dl)} = \frac{\text{جذب آزمایش}}{\text{جذب استاندارد}} \times ۱۰$$

۳-۸-۲- اندازه‌گیری آهن به روش Ferrozine

اساس آزمایش:

آهن وصل به ترانسفرین در محیط اسیدی به صورت یون فریک آزاد، سپس توسط یک احیاءکننده داخل معرف به یون فرو تبدیل می‌شود. این یون با Ferrozine ایجاد کمپلکس آبی رنگ می‌کند که شدت آن متناسب با مقدار آهن موجود در نمونه است (Burtis and Ashwood, 1996).

$$\text{Transferrin}(Fe^{3+})2 \xrightarrow{\text{Reducingbuffer}} 2Fe^{2+} + \text{Transferrin}$$

$$Fe^{2+} + 3\text{Ferrozine} \longrightarrow \text{Ferrous Ferrozine (blue complex)}$$

روش آزمایش:

پارامترهای لازم:

حرارت: ۳۷ درجه سانتی‌گراد — حجم معرف: ۱۰۵۰ میکرولیتر

طول موج: ٦١٠-٥٧٨ نانومتر — حجم نمونه: ۲۰۰ میکرولیتر

کووت: ترجیحاً فلوسل — اندازه‌گیری: خواندن مقابل بلانک معرف

جدول ۳-۳: دستورالعمل تنظیم دستگاه اتوآنالایزر جهت اندازه‌گیری مقدار آهن (Burtis and Ashwood, 1996)

	نمونه	**استاندارد**	**بلانک معرف**
نمونه مورد آزمایش	**۲۰۰ میکرولیتر**	–	–
استاندارد	–	**۲۰۰ میکرولیتر**	–
Reagent 2	**۱ میلی‌لیتر**	**۱ میلی‌لیتر**	**۱/۲ میلی‌لیتر**
Reagent 3	**۵۰ میکرولیتر**	**۵۰ میکرولیتر**	**۵۰ میکرولیتر**
۱۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید. جذب تست و استاندارد را در ۵۹۳ نانومتر مقابل بلانک معرف خوانده و یادداشت نمایید (زمان خواندن نباید از ۱۵ دقیقه تجاوز نماید).			

محاسبه:

$$\text{آهن } (\mu g/dl) = \frac{\text{جذب بلانک - جذب آزمایش}}{\text{جذب استاندارد}} \times ۲۰۰ \qquad \text{(معادله ۳-۲)}$$

۳-۸-۳- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) به روش IFCC

اساس آزمایش:

L-Aspartate Oxalacetate + 2-Oxoglutarate < -- AST --> L-Glutamate + Oxalacetate
Oxalacetate + NADH + H^+ <-- MDH --> L-Malate + NaD^+

روش آزمایش:

پارامترهای لازم:

حرارت: ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری: فتومتر روی صفر تنظیم شود

طول موج: ۳٤۰ نانومتر

قطر کووت: ۱ سانتی‌متر

جدول ۳-٤: دستورالعمل تنظیم دستگاه اتوآنالایزر جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (Bergmeyer *et al.*, 1986)

نمونه	**۱۰۰ میکرولیتر**
محلول مخلوط شده معرف ۱ و ۲	**۱۰۰۰ میکرولیتر**

یک دقیقه پس از مخلوط نمودن، مقدار جذب نوری را تعیین نموده و دقیقاً پس از ۱ و ۲ و ۳ دقیقه، اختلاف جذب نوری از دقیقه قبل را تعیین کنید.

محاسبه:

مقدار اختلاف جذب نوری پس از ۱ و ۲ و ۳ دقیقه را با هم جمع نموده و بر عدد ۳ تقسیم کرده، میانگین به دست آمده را در عدد ۱۹۸۵ ضرب نمایید.

۳-۸-٤- اندازه‌گیری پروتئین کل به روش Biuret

اساس آزمایش:

در شرایط قلیایی یون‌های کوپریک با اتم‌های کربونیل اکسیژن و آمید نیتروژن یک کمپلکس آبی متمایل به بنفش ایجاد می‌کند. شدت رنگ حاصل متناسب با مقدار پروتئین در نمونه است که در ٥٦۰-٥۲۰ نانومتر

اندازه‌گیری می‌شود (Tietz, 1986).

روش آزمایش:

پارامترهای لازم:

حرارت: ۳۷ درجه سانتی‌گراد — حجم معرف: ۲ میلی‌لیتر

طول موج: ۵۶۰-۵۲۰ نانومتر — حجم نمونه: ۵۰ میکرولیتر

کووت: ۱ سانتی‌متر — اندازه‌گیری: خواندن مقابل بلانک معرف

جدول ۳-۵: دستورالعمل تنظیم دستگاه اتوآنالایزر جهت اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل (Tietz, 1986)

	نمونه	استاندارد	بلانک معرف
نمونه	**۵۰ میکرولیتر**	-	-
استاندارد	-	**۵۰ میکرولیتر**	-
Total Protein Reagent	**۲ میلی‌لیتر**	**۲ میلی‌لیتر**	**۲ میلی‌لیتر**
۱۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و جذب‌ها را در مقابل بلانک معرف در ۵۴۰ نانومتر خوانده و یادداشت کنید. پایدای رنگ ۶۰ دقیقه است.			

محاسبه:

$$\text{پروتئین کل (g/dl)} = \frac{\text{جذب آزمایش}}{\text{جذب استاندارد}} \times ۶ \qquad \text{(معادله ۳-۳)}$$

۳-۸-۵- اندازه‌گیری کلسترول به روش CHOD-PAP

اساس آزمایش:

در این آزمایش، اکسیژن آزاد شده از کلسترول در مجاورت آنزیم کلسترول اکسیداز با ۴-آمینوآنتی پیرین و فنول در مجاورت آنزیم پراکسیداز تشکیل کینونیمین می‌دهد. میزان کینونیمین تشکیل شده که به صورت فتومتری قابل اندازه‌گیری است با مقدار کلسترول رابطه مستقیم دارد (Artiss and Zak, 1997).

$$\text{Cholesterol ester} + H_2O \xrightarrow{CHE} \text{Cholesterol} + \text{Fattyacid}$$
$$\text{Cholesterol} + O_2 \xrightarrow{CHO} \text{Cholesterol} - 3 - \text{One} + H_2O_2$$
$$2H_2O_2 + 4\text{Aminoantipyrine} + \text{Phenol} \xrightarrow{POD} \text{Quinoneimine} + 4H_2O$$

روش آزمایش:

پارامترهای لازم:

حرارت: ۲۰ تا ۲۵ یا ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری: فتومتر با بلانک روی صفر تنظیم شود

طول موج: ٥٤٦ نانومتر

قطر کووت: ۱ سانتی‌متر

جدول ۳-٦: دستورالعمل تنظیم دستگاه اتوآنالایزر جهت اندازه‌گیری مقدار کلسترول (Artiss and Zak, 1997)

	بلانک	نمونه یا استاندارد
نمونه یا استاندارد	–	**۱۰ میکرولیتر**
آب مقطر	**۱۰ میکرولیتر**	–
معرف	**۱۰۰ میکرولیتر**	**۱۰۰۰ میکرولیتر**
۲۰ دقیقه در دمای محیط (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) یا ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و حداکثر طی ٦۰ دقیقه جذب نوری استاندارد و نمونه‌ها را در برابر بلانک اندازه‌گیری نمایید.		

محاسبه:

$$\text{کلسترول (mg/dl)} = \frac{\text{جذب آزمایش}}{\text{جذب استاندارد}} \times ۲۰۰ \qquad \text{(معادله ۳-٤)}$$

۳-۸-٦- اندازه‌گیری تری‌گلیسرید به روش GPO

اساس آزمایش:

اندازه‌گیری تری‌گلیسیرید به روش آنزیماتیک بر اساس تعیین غلظت گلیسرولی است که از هیدرولیز آنها به دست می‌آید و بر طبق واکنش‌های زیر انجام می‌گیرد (Tietz, 1986):

$$\text{Triglycerides} + H_2O \xrightarrow{\text{Lipoprotein Lipase}} \text{Glycerol} + \text{Fatty acid}$$

$$\text{Glycerol ATP} \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{Glycerol Kinase}} \text{Glycerol-3-Phosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{Glycerol-3-Phosphate} + O_2 \xrightarrow{\text{GPO}} \text{Dihydroxyacetone Phosphate} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + 4\text{Aminoantipyrine} + \text{ADPS} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Red quinone} + 4\,H_2O$$

$$\text{ADPS} = \text{N-Ethyl N-Sulfopropyl-n-anisidine}$$

$$\text{GPO} = \text{Glycerol-3-Phosphate Oxidase}$$

روش آزمایش:

پارامترهای لازم:

حرارت: ۳۷ درجه سانتی‌گراد　　اندازه‌گیری: خواندن مقابل بلانک صفر

طول موج: (۵۷۰-۵۲۰) ٥٤٦ نانومتر

قطر کووت: ۱ سانتی‌متر

جدول ۳-۷: دستورالعمل تنظیم دستگاه اتوآنالایزر جهت اندازه‌گیری مقدار تری‌گلیسیرید (Tietz, 1986)

	بلانک	استاندارد	نمونه
معرف کاری	**۱ میلی‌لیتر**	**۱ میلی‌لیتر**	**۱ میلی‌لیتر**
آب مقطر	**۱۰ میکرولیتر**	-	-
استاندارد	-	**۱۰ میکرولیتر**	-
نمونه	-	-	**۱۰ میکرولیتر**
جذب نوری را پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری کنید. رنگ نهایی تا یک ساعت بعد پایدار است.			

محاسبه:

$$\text{تری‌گلیسرید (mg/dl)} = \frac{\text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری استاندارد}} \times ۲۰۰ \qquad \text{(معادله ۳-۵)}$$

۳-۸-۷- اندازه‌گیری گلوکز به روش Glucose Oxidase

اساس آزمایش:

اندازه‌گیری گلوکز به روش آنزیماتیک بر طبق واکنش‌های زیر انجام می‌شود (Burtis and Ashwood, 1996):

$$Glucose + O_2 \xrightarrow{GlucoseOxidase} Gluconic + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + Phenol + 4Aminoantipyrine \xrightarrow{Peroxidase} Red\ Quinone + 4H_2O$$

روش آزمایش:

پارامترهای لازم:

درجه حرارت: ۳۷ درجه سانتی‌گراد　　اندازه‌گیری: دستگاه را در مقابل بلانک صفر نمایید

طول موج: (۵۵۰-٤۹۲) ۵۰۰ نانومتر

قطر کووت: ۱ سانتی‌متر

جدول ۳-۸: دستورالعمل تنظیم دستگاه اتوآنالایزر جهت اندازه‌گیری مقدار گلوکز (Burtis and Ashwood, 1996)

	بلانک	استاندارد	نمونه
معرف	۱ میلی‌لیتر	۱ میلی‌لیتر	۱ میلی‌لیتر
آب مقطر	۱۰ میکرولیتر	–	–
استاندارد	–	۱۰ میکرولیتر	–
نمونه	–	–	۱۰ میکرولیتر
جذب نوری را پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری کنید. رنگ نهایی تا یک ساعت پایدار است.			

محاسبه:

$$\text{گلوکز (mg/dl)} = \frac{\text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری استاندارد}} \times ۱۰۰ \qquad \text{(معادله ۳-۶)}$$

۳-۹- اندازه‌گیری pH مایع تخمدانی

جهت اندازه‌گیری pH مایع سلومیک در هر مرحله، ابتدا بدن ماهی بخصوص مخرج و باله مخرجی آن کامل خشک شد، سپس پیش آبراه یا مخرج ماهی فشار داده شد تا ادرار آن خارج شود. سپس با ماساژ شکم به آرامی تخمک به همراه مایع تخمدانی روی یک صافی (توری ریز چشمه) ریخته شد تا مایع سلومیک جدا شده و در میکروتیوپ در دار جمع‌آوری شد. مایع سلومیک سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٤۰۰۰×g دور در دقیقه سانتریفوژ شد تا اگر سلول خونی همراه آن است جدا شود. یک ساعت بعد از نمونه‌برداری، pH مایع سلومیک توسط میکروالکترود اندازه‌گیری شد (Aegerter and Jalabert, 2004).

۳-۱۰- نمونه‌برداری تخمک جهت مطالعه مورفولوژی آن توسط میکروسکوپ نوری

در تیمار اول و آخر، برای مطالعه مورفولوژی تخمک و تغییرات آن در طی پدیده‌ی فوق رسیدگی از تخمک‌ها نمونه‌برداری شد. بدین صورت که بلافاصله پس از استحصال، تعداد ۱۰ عدد تخمک از هر مولد در ماده‌ی فرمالین بافر ۱۰ درصد که شامل ۱۰۰cc فرمالین ٤۰ درصد، ٤gr فسفات مونوسدیک، ٦/٥gr فسفات دی‌سدیک و ۹۰۰cc آب مقطر می‌باشد، فیکس شدند (پوستی و ادیب مرادی، ۱۳۸۵). مراحل هیستوتکنیک و سپس تهیه مقاطع ٥-۲ میکرونی انجام و پس از رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین و ائوزین، گسترش‌ها زیر

میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند (جزئیات مراحل هیستوتکنیک در پیوست آمده است).

۳-۱۱- نمونه‌برداری تخمک جهت مطالعه توسط Scanning Electron Microscope

۳-۱۱-۱- تثبیت نمونه‌ها

در مورد تخمک‌های تازه اووله شده و فوق رسیده به منظور بررسی وضعیت سوراخ میکروپیل، از تخمک‌ها نمونه‌برداری شد. بدین صورت که بلافاصله پس از استحصال، تعداد ۱۰ عدد تخمک از هر مولد در محلول ۳ درصد گلوتار آلدئید در ۰/۱ مول فسفات بافر (pH=۷/۳) به مدت ۸-٦ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد فیکس شدند.

۳-۱۱-۲- آماده سازی نمونه‌ها

به این منظور از روش عمومی آماده سازی بافت جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی استفاده شد (Rizzo *et al.*, 2003) که شامل مراحل زیر می‌باشد:

۱- شستشو با فسفات بافر (۳ بار تعویض بافر در دمای ٤°C)	۱ ساعت
۲- فیکس ثانویه توسط اسمیوم تتروکساید ۲ درصد (در دمای ٤°C)	۱ شبانه‌روز
۳- قرار دادن نمونه در اتانل ۳۰ درجه	۵ دقیقه
٤- قرار دادن نمونه در اتانل ۵۰ درجه	۱۵ دقیقه
۵- قرار دادن نمونه در اتانل ۷۰ درجه	۱۵ دقیقه
٦- قرار دادن نمونه در اتانل ۹۵ درجه (۲ بار تعویض)	هر یک ۱۵ دقیقه
۷- قرار دادن نمونه در اتانل مطلق (۲ بار تعویض)	هر یک ۲۰ دقیقه
۸- خشک کردن نمونه‌ها توسط Dryer	۱ شبانه‌روز
۹- پوشش دادن نمونه‌ها توسط طلا در ۱۵mV	۲-۱ دقیقه

بعد از مشاهده سطح تخمک‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی Zeiss DSM-960A، تصاویری از سوراخ میکروپیل تهیه شد.

۳-۱۲- طرح آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها

طرح آماری مورد استفاده در این تحقیق طرح کاملاً تصادفی است. در قالب این طرح، فواصل مختلف زمانی استحصال تخمک پس از اوولاسیون، از مولدین ماده به عنوان تیمارهای آزمایشی و مولدین به عنوان

تکرارهای آن در نظر گرفته شدند.

مقدار متابولیت‌ها در مایع تخمدانی بر حسب میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد بین‌المللی در لیتر بیان شد. در مورد تخمک‌ها، مقادیر به دو صورت عنوان شدند. به منظور ارائه مقادیر ثابت که به اندازه تخمک بستگی نداشته باشد، اعداد بر حسب میکروگرم (در مورد متابولیت‌ها) و واحد بین‌المللی (در مورد آنزیم) به ازای هر تخمک و هر میلی‌گرم از تخمک بیان شدند. برای مقایسه میانگین داده‌های حاصله از تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد و هم واریانسی داده‌های به دست آمده توسط آزمون Leven مورد بررسی قرار گرفت. از آزمون Welch برای مقایسه میانگین داده‌ها و از آزمون Tukey برای مقایسه دو به دوی میانگین‌ها استفاده شد. برای تعیین رابطه بین فاکتورهای مورد بررسی نمودار پراکندگی داده‌ها رسم شد و برای به دست آوردن رابطه بین فاکتورهای تخمک و مایع تخمدانی و فاکتورهای کیفیت تخمک نیز از رگرسیون چندگانه استفاده گردید. تمامی تحلیل‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفت.

فصل چهارم

نتـــایج

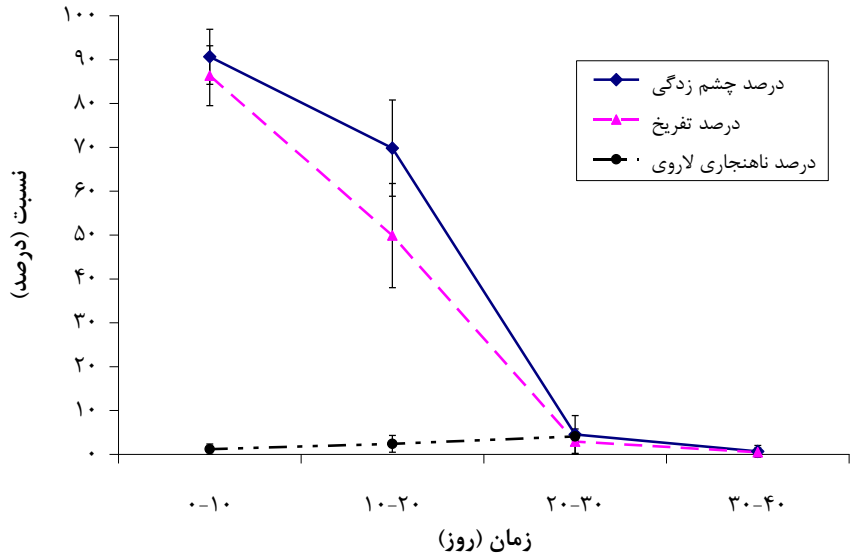
٤-١- تاثیر باقی ماندن تخمک‌ها پس از اوولاسیون بر کیفیت تخمک

در طول دوره نمونه‌برداری، کیفیت تخمک به شدت کاهش یافت. درصد چشم‌زدگی از ٦/٢٨±٩٠/٦٥ درصد در ١٠-٠ روز پس از اوولاسیون به ٠/٦٧±١/٣٤ درصد در ٤٠-٣٠ روز پس از اوولاسیون رسید. تفاوت درصد چشم‌زدگی بین تیمار اول و دوم (تا ٢٠ روز پس از اوولاسیون) معنی‌دار نبود (P>٠/٠٥) اما پس از آن دچار کاهش شدید شد. درصد تفریخ در طول فوق رسیدگی به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد (P>٠/٠٥) به طوری که از ٦/٨٢±٨٦/٣٣ درصد در ١٠-٠ روز پس از اوولاسیون به ٠/٤٩±٠/٩٨ درصد در ٤٠-٣٠ روز پس از اوولاسیون رسید (P<٠/٠٥). با این که درصد ناهنجاری لاروی افزایش تدریجی را با بروز فوق رسیدگی تخمک نشان داد اما این افزایش تا ٣٠-٢٠ روز پس از اوولاسیون معنی‌دار نبود (P>٠/٠٥). در مورد تیمار چهارم (٤٠-٣٠ روز پس از اوولاسیون)، امکان محاسبه درصد ناهنجاری لاروی برای ٩ مولد به دلیل از بین رفتن صد درصد تخم‌ها فراهم نشد (جدول ٤-١، شکل ٤-١).

جدول ٤-١: تاثیر باقی ماندن تخمک‌ها پس از اوولاسیون در حفره شکمی بر پارامترهای بقاء تخمک

پارامتر	زمان باقی ماندن تخمک در محوطه شکمی پس از اوولاسیون (روز)			
	١٠-٠	٢٠-١٠	٣٠-٢٠	٤٠-٣٠
چشم زدگی (٪)	٩٠/٦٥±٦/٢٨^{a}	٦٩/٨٠±١٠/٩٨^{a}	٤/٥٤±٤/٣٢^{b}	٠/٦٧±١/٣٤^{b}
تفریخ (٪)	٨٦/٣٣±٦/٨٢^{a}	٤٩/٨٨±١١/٨٧^{b}	٢/٩٢±٢/٨٧^{c}	٠/٤٩±٠/٩٨^{c}
ناهنجاری لاروی (٪)	١/١٩±١/٢^{a}	٢/٤٠±١/٩٢^{a}	٤/٠٨±١/٠٢^{a}	-

اعدادی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند، تفاوت معنی‌دار ندارند (P>٠/٠٥)



شکل ٤-١: تغییرات درصد چشم زدگی، تفریخ و ناهنجاری لاروی در طول نگهداری تخمک در زمان‌های مختلف در حفره شکمی میانگین و انحراف معیار نشان داده شده است.

٤-٢- تاثیر باقی ماندن تخمک‌ها پس از اوولاسیون بر پارامترهای مایع تخمدانی

از بین فاکتورهای مورد بررسی در مایع تخمدانی، مقدار تری گلیسیرید در طول نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P>0/05$) اما سایر فاکتورهای مورد بررسی تغییر کرد. pH به شدت کاهش یافت در حالی که مقدار گلوکز، کلسترول، پروتئین، کلسیم، آهن و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز به شدت افزایش یافت (جدول ٤-٢).

جدول ٤-٢: تاثیر باقی ماندن تخمک‌ها پس از اوولاسیون در حفره شکمی بر پارامترهای مایع تخمدانی

پارامتر	زمان باقی ماندن تخمک در محوطه شکمی پس از اوولاسیون (روز)			
	۰-۱۰	۱۰-۲۰	۲۰-۳۰	۳۰-٤۰
گلوکز (mg/100ml)	۳۸/۰۷±٤/۹۰^{a}	٦۲/۰۰±٦/۰٥^{b}	٦٦/۳۳±۱۲/۰۱^{b}	۷۲/٦۷±۸/٥۰^{b}
کلسترول (mg/100ml)	۱۱/۱۳±۳/۲۰^{a}	۱٦/۷٥±۲/۷٥^{a}	۳۱/٦۷±٤/۰٤^{a,b}	٤٦/۰۰±۲۱/۲۸^{b}
تری‌گلیسیرید (mg/100ml)	۹/۹۰±۰/٦٦^{a}	۲۰/۰۰±٦/۹۸^{a}	۲٦/۳۰±۱۳/۷٥^{a}	۲۹/۳۳±۲٥/٦۹^{a}
پروتئین کل (mg/100ml)	۲۲۳/۳±٤٥/۰۹^{a}	۲۷۷/٥±٥٥/٦۰^{a}	٥۲۰/۰±۸٥/٤٤^{a,b}	٦٥۰/۰±۲۷٤/۰٤^{b}
کلسیم (mg/100ml)	٥/۳۰±۰/٦۲^{a}	۹/۳۲±۰/٦۰^{b}	۹/۸۳±۱/۱۰^{b}	۱۰/٦۳±۰/۹۸^{b}
آهن (mg/100ml)	٦٤/۳۳±۲٥/۰۰^{a}	٥۰۲/۳±۳۰۳/۰٥^{a,b}	۷۰۸/۷±۲۰٥/۰۱^{a,b}	۹۷۱/۷±٤۱۳/۸۹^{b}
آسپارتات آمینوترانسفراز (IU/lit)	۱۰/٦۷±٥/۱۳^{a}	۷٦/۰۰±۱۹/۷٦^{a,b}	۹۲/۰۰±۳۳/۰۰^{b}	۱٦٦/۷±٤۲/۱۲^{c}
pH	۸/۳۲±۰/۱۲^{a}	۸/۲۲±۰/٤٤^{a}	۷/۸۸±۰/٤۷^{b}	۷/۷۲±۰/۱۳^{b}

اعدادی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند، تفاوت معنی‌دار ندارند ($P>0/05$)

٤-٣- تاثیر باقی ماندن تخمک پس از اوولاسیون بر پارامترهای بیوشیمیایی تخمک

فاکتورهای بیوشیمیایی تخمک، تغییرات زیادی را در بین مولدین در تیمارهای مختلف نشان داد. مقدار گلوکز، کلسترول، کلسیم و آهن تفاوت معنی‌دار را در بین تیمارها نشان نداد ($P>0/05$). مقدار پروتئین و تری‌گلیسیرید به ازای هر میلی‌گرم تخمک ثابت اما به ازای هر تخمک به دلیل اندازه غیر یکسان تخمک‌ها، در برخی تیمارها تفاوت آن معنی‌دار بود ($P<0/05$). همچنین فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز هم در تخمک و هم در هر میلی‌گرم تخمک افزایش یافت (جدول ٤-٣).

٤-٤- ارتباط پارامترهای تخمک و مایع تخمدانی با کیفیت تخمک

آنالیز رگرسیون چندگانه نشان داد که درصد چشم زدگی با مقدار کلسترول، پروتئین، کلسیم، فعالیت

آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز و pH مایع تخمدانی رابطه دارد به طوری که رابطه بین درصد چشم‌زدگی و مقدار پروتئین (P<۰/۰۵ و r=۰/۹۰٤) و درصد چشم زدگی و pH بسیار شدید بود (P<۰/۰۵ و r=۰/۹۷۵). از بین فاکتورهای بیوشیمیایی تخمک نیز درصد چشم‌زدگی با مقدار کلسترول، آهن و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز رابطه داشت (جدول ٤-٤). درصد تفریخ با مقدار گلوکز، کلسترول، پروتئین، کلسیم، فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز و pH مایع تخمدانی رابطه داشت. ارتباط درصد تفریخ با pH (P<۰/۰۵ و r=۰/۹۹۸)، کلسترول (P<۰/۰۵ و r=۰/۹۲٦) و پروتئین (P<۰/۰۵ و r=۰/۹۰۱) کاملاً معنی‌دار بود. همچنین درصد تفریخ با مقدار کلسترول و آهن تخمک و با فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز رابطه داشت (جدول ٤-٥). همچنین رگرسیون چندگانه ارتباط درصد ناهنجاری لاروی را با مقدار کلسترول، تری‌گلیسیرید، پروتئین، آهن و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز و با pH مایع تخمدانی نشان داد. ارتباط درصد ناهنجاری لاروی با همه فاکتورهای فوق کاملاً معنی‌دار بود. درصد ناهنجاری لاروی با مقدار کلسترول، تری‌گلیسیرید و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز تخمک نیز رابطه داشت (جدول ٤-٦).

جدول ٤-٣: تاثیر باقی ماندن تخمک‌ها پس از اوولاسیون در حفره شکمی بر پارامترهای بیوشیمیایی تخمک

پارامتر	زمان باقی ماندن تخمک در محوطه شکمی پس از اوولاسیون (روز)			
	۰-۱۰	۱۰-۲۰	۲۰-۳۰	۳۰-٤۰
گلوکز (µg/egg)	۳٦/٤۷±٤/۳۲[a]	۱۸/۱۵±۵/۲۷[a]	۱۸/۸۱±۸/۰۰[a]	۳۱/۳۷±۱۵/۲۸[a]
(µg/mg egg)	(۰/٦۱±۰/۱۸)[a]	(۰/۳٤±۰/۹۹)[a]	(۰/۳۱±۰/۱۷)[a]	(۰/٦٦±۰/۲۹)[a]
کلسترول (µg/egg)	۳۰۱/۷۰±۵۳/۸۵[a]	۲۷۹/۵۸±۳۵/۷۲[a]	۲۹۷/۳۷±۸۵/٦۳[a]	۲٤٤/٦۰±۱۱۱/٤٤[a]
(µg/mg egg)	(۵/٦۹±۱/۲۳)[a]	(۵/۲۸±۰/٦۷)[a]	(٤/۷۵±۱/۱۲)[a]	(٤/۹±۱/٦۸)[a]
تری‌گلیسیرید (µg/egg)	۷۵۵/۵۵±٤۸/۵۸[a]	٦٤٦/٦۰±٤۱/۵۱[a,b]	۷۲۸/۲۰±۹۱/۵۳[a]	۵٤۵/٦۰±۸۸/۱۹[b]
(µg/mg egg)	(۱٤/۲۰±۱/٤٦)[a]	(۱۲/۲±۰/۷۸)[a]	(۱۱/٦۷±۰/٤٦)[a]	(۱۱/٤۰±۲/۲۲)[a]
پروتئین کل (µg/egg)	۱۷۰۸۰±۵۰۸/٦۲[a]	۱۳۵۸۱±۹۵۲/٤۰[a,b]	۱۷۰۹٤±۵۲۳/۸٦[a]	۱۱۵٤۱±۲۵۷٦/٦۳[b]
(µg/mg egg)	(۳۲۰/۸۳±۲۲/۳۳)[a]	(۲۵٦/۲۵±۱۷/۹۷)[a]	(۲۷۵/٦۷±۲۱/۱۳)[a]	(۲٤۱/۵۰±۵۹/۳٦)[a]
کلسیم (µg/egg)	۵۸/۱۹±۱٦/۸۸[a]	٦٤/٦٦±٦/۲٤[a]	۷٦/۳٤±۱۲/۹٤[a]	۵٦/٤٦±٤/۲۳[a]
(µg/mg egg)	(۱/۱±۰/۳٦)[a]	(۱/۲۲±۰/۱۲)[a]	(۱/۲۲±۰/۱۰)[a]	(۱/۱۹±۰/۲٦)[a]
آهن (µg/egg)	۱٤۹۳/٤±٤۹۱/۱۳[a]	۱۰۹٤/۵±۲۰۸/۵[a]	۱۰٦٤/۱±۷۱/٦٤[a]	۸۹۱/۷۰±۱٦۳/۰٤[a]
(µg/mg egg)	(۲۸/۲٦±۱۰/۳٦)[a]	(۲۰/٦۵±۳/۹۳)[a]	(۱۷/۲۷±۲/۹۵)[a]	(۱۹/۵۵±۸/۹۲)[a]
آسپارتات آمینوترانسفراز (IU/egg)	۰/۰۱۱±۰/۰۰۳[a]	۰/۰۱٤±۰/۰۱۰[a]	۰/۰٤۲±۰/۰۳۰[a,b]	۰/۰٦۳±۰/۰۱۸[b]
(IU/mg egg)	(۰/۰۰۰۲±۰/۰۰۰۵)[a]	(۰/۰۰۰۳±۰/۰۰۰۲)[a]	(۰/۰۰۰۷±۰/۰۰۰۵)[ab]	(۰/۰۰۱۳±۰/۰۰۰۵)[b]

اعدادی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند، تفاوت معنی‌دار ندارند (P>۰/۰۵)

جدول ٤-٤: مدل‌های رگرسیون برای پیش‌بینی درصد چشم‌زدگی با استفاده از پارامترهای مایع تخمدانی و تخمک در طول فوق رسیدگی

پارامتر	R	مدل رگرسیون	R^2	F-Value
پارامترهای مایع تخمدانی				
کلسترول	۰/۷۵۰	y= −۱/٦۲x+۸٦/۷۳	۰/٥٦۲	۸/۹۹۰
پروتئین کل	۰/۹۰٤	$y=-۰/٥۲x+۰/۰۰۰۳x^2+۱۸۲/۳٥$	۰/۸۱۸	۱۳/٤۸۷
کلسیم	۰/٦۷٤	y=−۱٤/۷٦x+۱۸۰/۱۱	۰/٤٥٤	٥/۸۲۱
آسپارتات آمینوترانسفراز	۰/۷٥٦	y=−۰/٤۹x+۹۱/۷۷	۰/٥۷۱	۹/۳۲٥
pH	۰/۹۷٥	$y=-۲۸۱۳/٤۸x+۱۸٥/۰۷x^2+۱۰٦۹۱/۲٥$	۰/۹٥۰	٤۸/۰۱۸
پارامترهای تخمک				
کلسترول	۰/۸٦۱	$y=-۹/۸۰x+۰/۰٤x^2-٥/۷۹x^2+٦۷۸/۷٥$	۰/۷٤۲	٦/٦۹٤
آهن	۰/٦٥۹	y=۰/۱۱ x−۸۲/۹۸	۰/٤۳٥	٦/۹۲٥
	(۰/۸۸٥)	$(y=۲٦/۳٥x+۱۳/٤٤x^2-۰/۰۱x^3-۳۳۹/۹٥)$	(۰/۷۸٦)	(۱٤/٤۲٤)
آسپارتات آمینوترانسفراز	۰/٦۸۱	y=−۰/۹٥x +٦۸/۳۲	۰/٤٦٤	۷/۷۹۲
	(۰/٦٥۲)	(y=−٤۱/۹۷x+٦٤/۱۳)	(۰/٤۲٥)	(٦/٦٤۹)

در مدل رگرسیون، درصد چشم‌زدگی به عنوان متغیر وابسته و پارامترهای آنالیزی به عنوان متغیر مستقل می‌باشند

اعدادی که داخل پرانتز آمده‌اند بر حسب میکروگرم به ازای هر میلی‌گرم از تخمک هستند (**N**=٤۰، **P**<۰/۰٥)

جدول ٤-٥: مدل‌های رگرسیون برای پیش‌بینی درصد تفریخ با استفاده از پارامترهای مایع تخمدانی و تخمک در طول فوق رسیدگی

پارامتر	R	مدل رگرسیون	R^2	F-Value
پارامترهای مایع تخمدانی				
گلوکز	۰/۷۹۳	$y=-۲/۱٤\ x+۱٦۸/۵٤$	۰/٦۲۹	۱۱/۸٤٤
کلسترول	۰/۹۲٦	$y=-۵/۹۵\ x+۰/۵۹x^2+۱۳٤/۱۲$	۰/۸۵۸	۱۸/۱۳۳
پروتئین کل	۰/۹۰۱	$y=-۰/٤٤x+۰/۰۰۰۲x^2+۱۵۰/۹۷$	۰/۸۱۲	۱۲/۹٦
کلسیم	۰/۷۷۹	$y=-۱٤/۰۹٤x+۱٦٤/٤٤$	۰/٦۰٦	۱۰/۷۸٤
آسپارتات آمینوترانسفراز	۰/۸۳۱	$y=-۰/۸۲x+۰/۰۰۱x^2+۹۱/۵۰$	۰/٦۹۰	٦/۷۰۵
pH	۰/۹۹۸	$y=-۳۲٦۹/٤۹x+۲۱۲/۲۹x^2+۱۲۵۸٦/۲۰$	۰/۹۹۷	۹۰/۲۷۸
پارامترهای تخمک				
کلسترول	۰/۸۸۲	$y=-۷/۵۸x+۰/۰۳٤x^2-٤/۵x^3+۵۲۳/۸۰$	۰/٦۷٦	٤/۸۷۲
آهن	۰/٦۷٦	$y=۰/۰۹x-۷۲/۱۱$	۰/٤۵۷	۷/۵۸۸
	(۰/۸۳۸)	$(y=۲۰/۲٤x+۱۸/۲۸x^2-۰/۰۱۱x^3-۲٦۲/۱٤)$	(۰/۷۰٤)	(۹/۵)
آسپارتات آمینوترانسفراز	۰/٦٦۷	$y=-۰/۷٦x+۵۳/۸۳$	۰/٤٤۵	۷/۲۱۵
	(۰/٦۳٦)	$(y=-۳۳/۵٤x+۵۰/۳٦)$	(۰/٤۰٤)	(٦/۰۹۸)

در مدل رگرسیون، درصد چشم‌زدگی به عنوان متغیر وابسته و پارامترهای آنالیزی به عنوان متغیر مستقل می‌باشند
اعدادی که داخل پرانتز آمده‌اند بر حسب میکروگرم به ازای هر میلی‌گرم از تخمک هستند (**N**=٤۰، **P**<۰/۰۵)

جدول ٤-٦: مدل‌های رگرسیون برای پیش‌بینی درصد ناهنجاری لاروی با استفاده از پارامترهای مایع تخمدانی و تخمک در طول فوق رسیدگی

پارامتر	R	مدل رگرسیون	R^2	F-Value
پارامترهای مایع تخمدانی				
کلسترول	۰/۹۳٦	$y=۰/۱۹x-۱/۰۳$	۰/۸۷۷	۳۵/٥٦۷
تری‌گلیسیرید	۰/۹٦۱	$y=۰/۲٤x-۲/۲$	۰/۹۲۳	٥۹/۹۹۷
پروتئین کل	۰/۹۱٤	$y=۰/۰۱x-۱/۸٤$	۰/۸۳٦	۲٥/٤٥٦
آهن	۰/۹٥۷	$y=۰/۰۳x-٦/٤۸x^2+٤/۰۹x^3-۰/۱٦$		
آسپارتات آمینوترانسفراز	۰/۹۲۲	$y=-۰/۰۲x+۰/۰۰۰۳x^2+۲/۱٤$	۰/٦۸۲	۱۰/۷۱۲
pH	۰/۹۲۷	$y=-۱۳/۷٦x+۱۱٤/۷۹$	۰/۸٦۰	۲٤/٥۳۸
پارامترهای تخمک				
کلسترول	(۰/۸۸۳)	$(y=-۱۹/٥٥x+۱/۹۳x^2+٥۱/۰٤)$	(۰/۷۷۹)	(۸/۸٥۱)
تری‌گلیسیرید	(۰/۷۰۷)	$(y=-۲/۷٦x+۳۷/٦۳)$	(۰/٥۰۰)	(٦/۰۱۳)
آسپارتات آمینوترانسفراز	۰/۹٥۲	$y=-۲/۱٦x+۰/۰۹x^2-۰/۰۰۱x^3+۱٤/۱٦$	۰/۹۰۷	۱۳/۰٤۸
	(۰/۸۳٦)	$(y=-۳۰/۰۰۳x+۳۸/۲۱x^2+٦/٤٥)$	(۰/٦۹۸)	(٥/۸۰۱)

در مدل رگرسیون، درصد ناهنجاری لاروی به عنوان متغیر وابسته و پارامترهای آنالیزی به عنوان متغیر مستقل می‌باشند (**N**=۳۱، **P**<۰/۰٥)

٤-٥- ارتباط بین متغیرهای مورد بررسی در تخمک و مایع تخمدانی

آزمون ضریب همبستگی پیرسون در سطح $P<۰/۰٥$ نشان داد که بین درصد چشم‌زدگی و درصد تفریخ ارتباط معنی‌دار مثبت و بین درصد چشم‌زدگی و درصد ناهنجاری لاروی ارتباط معنی‌دار منفی برقرار است. اگرچه این ارتباط بین درصد تفریخ و درصد ناهنجاری لاروی معنی‌دار نبود. همچنین رابطه‌های مهم فیزیولوژیک بین فاکتورهای تخمک و مایع تخمدانی در جدول ٤-۷ آمده است.

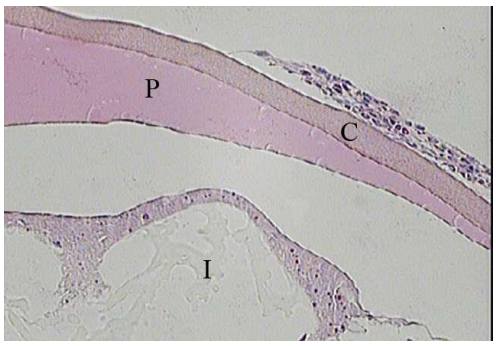
جدول ٤-۷: ارتباط‌های مهم فیزیولوژیک بین پارامترهای تخمک و مایع تخمدانی (P<۰/۰٥)

همبستگی	R
بین پارامترهای بقاء تخمک	
درصد چشم زدگی – درصد تفریخ	۰/۹۷٥
درصد چشم زدگی – درصد ناهنجاری لاروی	-۰/۷۳۷

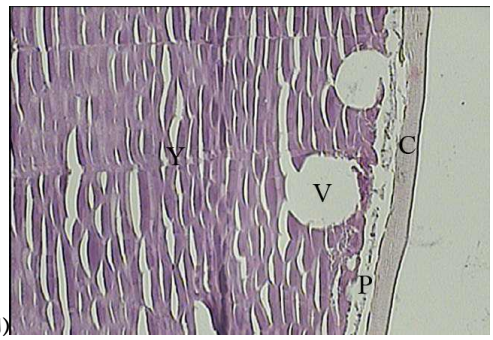
بین پارامترهای مایع تخمدانی	
pH – پروتئین کل	**-۰/۸۹۸**
pH – آسپارتات آمینوترانسفراز	**-۰/۹۱۷**
پروتئین کل – آسپارتات آمینوترانسفراز	**۰/۸۷۱**

٤-٦- تاثیر باقی ماندن تخمک پس از اوولاسیون بر ساختار تخمک از نظر بافت شناسی

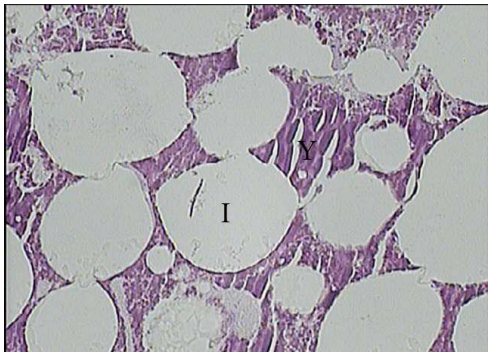
در تخمک‌های تازه اوولـه شـده (۱۰-۰DPO)، قطـر کوریـون ۳/٤٥±۲۳/۲۱ میکـرون و قطـر فضـای پری‌وتیلین ۸/۰۱±۲۰/۸۳ میکرون برآورد شد. کورتیکال وزیکول‌ها که در حاشیه تخمک در غشاء پلاسمایی واقع شده بودند دارای اندازه‌های متفاوت بوده و میانگین قطر آنها ۱۹/۵۲±٤۸/۳٥ میکرون اندازه‌گیری شـد. همچنـین زرده دارای بافـت کـاملاً همگـن بـود. در تخمـک‌هـای فـوق رسـیده (٤۰-۳۰DPO)، قطـر کوریـون تقریبـاً ثابـت بـود (۲/۸۸±۲۲/۹۸ میکـرون). قطـر کورتیکـال وزیکـول‌هـا ۱۳/٤٥±٦۳/۲۳ میکرون اندازه‌گیری شد. قطر فضای پری‌وتیلین دارای نوسـانات زیـاد از ۱۷/۳ میکـرون تـا ۹۱/۲ میکرون بود. زرده به صورت بافت ناهمگنی درآمد که در بخش اعظـم آن گنجیـدگی‌هـایی کـه دارای قطـری از ۱۲/٦۹ میکـرون تـا ۹۷/٤ میکـرون بودنـد، تشـکیل شـده بـود (شکل ٤-۲).



(ب)



(الف)



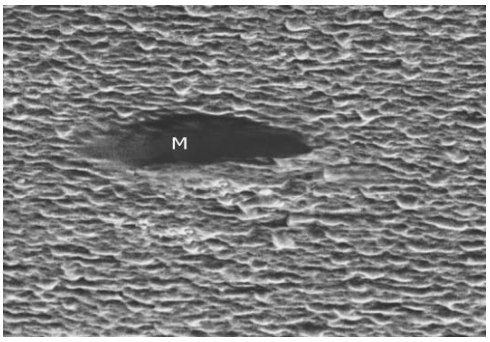
(ج)

شکل ٤-٢: تغییرات بافتی تخمک در ماهی آزاد دریای خزر در دوره فوق رسیدگی

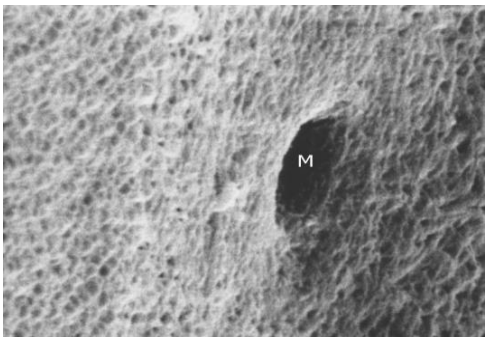
C: کوریون، P: فضای پری‌ویتلین، V: کورتیکال وزیکول، I: گنجیدگی، Y: زرده

(الف) تخمک تازه اوله شده (H & E × ٤٥٠) (ب) تخمک فوق رسیده: به اختلاف قطر فضای پری‌ویتلین و ناهمگن شدن بافت زرده توجه شود (H & E × ٤٥٠) (ج) گنجیدگی‌های متعدد ایجاد شده در زرده در تخمک فوق رسیده (H & E × ٤٥٠)

همچنین مطالعه سطح تخمک توسط میکروسکوپ الکترونی نشان داد که تغییری در وضعیت سوراخ میکروپیل در اثر فوق رسیدگی حاصل نشده است. قطر سوراخ میکروپیل در تخمک‌های تازه اوله شده ٦/٧٤±١/٧٥ میکرون و در تخمک‌های فوق رسیده ٦/٣٢±٢/٠٤ میکرون اندازه‌گیری شد (شکل ٤-٣).



(الف)



(ب)

شکل ٤-٣: تصویر الکترونی سطح تخمک ماهی آزاد دریای خزر (M: میکروپیل)

(الف) تخمک تازه اوله شده (٥٠٠٠×) (ب) تخمک فوق رسیده (٥٠٠٠×).

به باز بودن سوراخ میکروپیل در هر دو تصویر دقت شود.

فصل پنجم

بحث و نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان داد، که کیفیت تخمک ماهی آزاد دریای خزر در اثر ماندن در حفره شکمی پس از اوولاسیون و ایجاد فوق رسیدگی به شدت کاهش می‌یابد. نتایج تحقیقات قبلی به عمل آمده نیز موید این موضوع است (Nomura *et al.*, 1974; Craik and Harvey, 1984, Lahnsteiner, 2000; Aegerter and Jalabert, 2004; Mohagheghi Samarin *et al.*, 2008). تغییر در کیفیت تخمک با تغییرات زیادی از نظر فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در تخمک و مایع تخمدانی همراه است به طوری که برخی از آنها برای تعیین کیفیت تخمک نیز مناسب هستند.

تطابق دقیق زمان اوولاسیون با حداکثر سطح هورمون‌های موثر بر آن، در مطالعه Scott *et al.*, (1983) و همچنین Springate *et al.*, (1984) نشان داده شده و به خوبی تایید می‌نماید که زمان اوولاسیون تعیین شده به روش دستی (مصنوعی) کاملاً دقیق می‌باشد. لذا در این مطالعه، نیازی به اندازه‌گیری سطوح هورمونی جهت تایید زمان اوولاسیون وجود نداشت. همچنین از آن جا که هدف نهایی از این مطالعه، ارائه یک راهکار عملی برای استحصال بهترین تخمک‌ها از جهت کیفیت می‌باشد، زمان اوولاسیون با معاینه مولدین مشخص گردید تا در بعد عملی نیز انجام آن امکان‌پذیر باشد.

در این تحقیق، تخم‌کشی از مولدین با فواصل ۱۰ روزه انجام شد. زیرا در مطالعه Mohagheghi Samarin *et al.*, (2008) بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان که در شرایط تقریباً مشابه در کارگاه شهید باهنر انجام شد، کاهش کیفیت تخمک ناشی از فوق رسیدگی در فاصله DPO ۳۵-۲۸ گزارش گردید. علت دیگر انتخاب فواصل ۱۰ روزه جهت نمونه‌برداری، حساسیت زیاد مولدین ماهی آزاد و احتمال مرگ آنها در اثر تخم‌کشی‌های متوالی بود.

لازم به ذکر است که دستکاری مولدین، تاثیری بر کیفیت تخمک‌ها ندارد (Gaudemar and Beall, 1998). در واقع نشان داده شده است که دستکاری متناوب مولدین ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان و استرس ناشی از آن، بر بقای تخم‌ها و لاروها تاثیرگذار نیست (Lahnsteiner, 2000). همچنین تغییرات ایجاد شده در محتوای مایع سلومیک، برای مولدین قزل‌آلایی که تنها یک بار تخم‌کشی گردیدند، مشابه تغییرات مایع سلومیک مولدینی است که چندین بار تخم‌کشی شده‌اند (Lahnsteiner, 2000). بنابراین تغییر در ترکیب مایع سلومیک، به دلیل تغییر در ترشحات تخمدان، در طی دوره پس از اوولاسیون بوده و مرتبط با صدمه دیدن تخمک‌ها به جهت تخم‌کشی‌های متوالی و دستکاری مولدین نمی‌باشد (Aegerter and Jalabert, 2004). لذا می‌توان چنین ادعا نمود که تغییر کیفیت تخمک‌ها در طی دوره پس از اوولاسیون، متاثر از تعداد دفعات تخم‌کشی در مولدین ماده نبوده و ناشی از افزایش زمان ماندگاری

تخمک‌ها در مایع سلومیک، پس از اوولاسیون می‌باشد.

اگرچه عدم رعایت شرایط بهداشتی می‌تواند سبب ایجاد عفونت‌های باکتریایی بالا رونده تخمک‌ها در مولدین شود اما مطالعات نشان داده است که کاهش نرخ چشم‌زدگی و تفریخ برای تخمک‌هایی که به مدت بیشتری پس از اوولاسیون، در محوطه شکمی مولدین ماده باقی می‌مانند، نمی‌توانند به علت تخریب کیفیت تخمک‌ها بر اثر عفونت‌های باکتریایی و میکروبی باشد. زیرا نشان داده شده است که پروتئین‌های مترشحه در مایع سلومیک (TOPs= Trout Ovulatory Proteins) در طی دوره پس از اوولاسیون، می‌توانند یک نقش مهم را در حفاظت تخمک‌های اوله شده بر علیه عفونت‌های باکتریایی داشته باشند (Coffman and Goetz, 1998; Evans and Claiborne, 2005). همچنین گروهی از پروتئین‌ها که پس از اوولاسیون از طریق تخمدان به مایع سلومیک ترشح می‌گردند، فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده پروتئین را در مایع سلومیک محدود کرده و کنترل می‌نمایند (Coffman and Goetz, 1998; Evans and Claiborne, 2005). این پروتئین‌ها نسبت به گرما و اسیدیته مقاوم هستند و لذا مقاومت آنها نسبت به این دو عامل را می‌توان یک حفاظت طبیعی در مقابل تخریب کیفیت تخمک‌ها در نظر گرفت، چرا که معمولاً دوره پس از اوولاسیون در ماهیان سردآبی با افزایش دمای محیط و همچنین کاهش pH مایع سلومیک همراه خواهد بود. همچنین تعدادی دیگر از پروتئین‌های مترشحه از تخمک به مایع سلومیک در طی دوره پس از اوولاسیون، از طریق مکانیسم‌های مختلفی در دفاع بر علیه عوامل مخرب تخمک‌ها که آنزیم‌های پروتئاز رها شده از تخمک‌های اوله شده هستند، دخیل‌اند (Rime *et al*., 2004).

با گذر زمان پس از اوولاسیون و عدم استحصال تخمک‌های اوله شده توسط عمل تخم‌کشی، تخمک‌ها فوق رسیده شده و بنابراین قابلیت لقاح را از دست خواهند داد. ایجاد حالت فوق رسیدگی در تخمک‌های مولد ماده ماهی آزاد دریای خزر یکباره نبوده و همزمان در تمامی تخمک‌ها اتفاق نمی‌افتد. در واقع، هنگام معاینه می‌توان مولدینی را یافت که تنها تعدادی از تخمک‌های آنها فوق رسیده شده‌اند. با گذر چندین روز دیگر، به تدریج تمام تخمک‌ها در چنین مولدی فوق رسیده خواهند شد. از نظر ظاهری، ایجاد لکه نارنجی رنگ بر روی تخمک، نشان دهنده فوق رسیدگی آن می‌باشد. با توجه به نتایج حاصله در مطالعه Azuma *et al*., (2003) مبنی بر تجمع قطرات چربی و ظهور آنها به صورت لکه در تخمک فوق رسیده، می‌توان لکه نارنجی رنگ ظاهر شده بر روی تخمک را به تجمع قطرات چربی در تخمک، در طی دوره پس از اوولاسیون نسبت داد.

عدم اندازه‌گیری درصد لقاح در این مطالعه، به علت عدم یکسان بودن مدت زمان ماندگاری تخمک‌ها

در محوطه شکمی، پس از اوولاسیون می‌باشد. این امر بر زمان شروع تقسیمات سلولی و سرعت انجام این تقسیمات تاثیرگذار می‌باشد. کاهش تعداد بلاستومرها برای تخمک‌هایی که به مدت بیشتری پس از اوولاسیون، در محوطه شکمی مولدین باقی می‌مانند، مشاهده شده است (Azuma *et al.*, 2003). این پدیده تاخیر در امر تقسیمات سلولی را نشان داده و تایید می‌نماید که پیشرفت مراحل توسعه جنینی، با افزایش زمان ماندگاری تخمک‌ها در محوطه شکمی پس از اوولاسیون، آهسته‌تر و کندتر می‌گردد. علت این تاخیر در تخمک‌های مسن‌تر، طولانی‌تر شدن زمان از بین رفتن کورتیکال وزیکول‌ها توسط آب در مقایسه با تخمک‌های عادی عنوان شده است (Nomura *et al.*, 1974). به جهت وجود چنین تاخیری در امر تقسیمات سلولی برای تخمک‌هایی که به مدت بیشتری پس از اوولاسیون در محوطه شکمی باقی مانده‌اند، ممکن است تعدادی از تخمک‌های لقاح یافته در محاسبه مربوط به درصد لقاح که به مدت مشخصی پس از لقاح، بر اساس وجود و یا عدم وجود تقسیمات سلولی انجام می‌شود وارد نگردند. در واقع ممکن است تخم‌های لقاح یافته‌ای وجود داشته باشند که تقسیمات سلولی را نشان ندهند. درصدهای چشم‌زدگی و تفریخ بالاتر از درصد لقاح که در مطالعه Azuma *et al.*, (2003) برای تخمک‌های استحصال شده به مدت ۱۰ روز و بیشتر پس از اوولاسیون مشاهده گردید، موید این مطالب می‌باشد.

از آنجا که در پیدایش تخم هر دو عامل تخمک و اسپرم دخیل‌اند، لذا در مواردی که تفاوت در کیفیت تخمک‌ها مورد سنجش قرار می‌گیرد، توجه به یکسان بودن کیفیت اسپرم برای تخمک‌ها، ضروری است. به جز Lahnsteiner (2000)، Azuma *et al.*, (2003) و Rime *et al.*, (2004) که جهت یکسان نمودن کیفیت اسپرم در مطالعه خود از اسپرم منجمد شده استفاده نمودند، سایر مطالعات اشاره‌ای به این موضوع نداشته‌اند. در حالی که نتایج حاصله به میزان زیادی متاثر از کیفیت اسپرم بوده و عدم توجه به این عامل، می‌تواند یک نقص عمده را در مطالعه ایجاد نماید. در مطالعه حاضر، امکان استفاده از اسپرم منجمد شده وجود نداشت و برای هر نوبت تکثیر، ۸ عدد مولد نر جهت اسپرم‌گیری مورد استفاده قرار گرفته و مخلوطی از اسپرم آنها که کاملاً همگن گردید، جهت تکثیر به کار گرفته شد. لذا می‌توان ادعا نمود که تقریباً کیفیت اسپرم به کار رفته برای نوبت‌های مختلف تکثیر، یکسان بوده است (Aegerter and Jalabert, 2004; Mohagheghi Samarin *et al.*, 2008).

اگرچه در قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌توان تخمک‌ها را در دمای $^{\circ}C$ ۸ حداقل به مدت ۲ هفته (Mohagheghi Samarin *et al.*, 2008) و در دمای $^{\circ}C$ ۱۲-۱۰ حداقل به مدت ۱ هفته بدون کاهش کیفیت در حفره شکمی مولدین نگهداشت (Springate *et al.*, 1984; Aegerter and Jalabert, 2004)، اما در

ماهی آزاد دریای خزر در دمای $7^{\circ}C$، درصد چشم‌زدگی تا ۲۰DPO و درصد تفریخ تا ۱۰DPO بالا بود و پس از آن دچار کاهش شدید شد. همچنین ارتباط بسیار معنی‌دار مثبت بین درصد چشم‌زدگی و تفریخ ($P<۰/۰۵$ و $r=۰/۹۷۵$) نشان داد که تلفات تخم به دلیل پایین بودن کیفیت تخمک غالباً تا قبل از چشم‌زدگی حاصل می‌شود.

در این تحقیق، درصد ناهنجاری لاروی تا ۳۰ روز پس از اوولاسیون تفاوت معنی‌دار نداشت و این نتیجه با گزارشات قبلی در مورد ثابت بودن درصد ناهنجاری لاروی در قزل‌آلای رنگین کمان، در اثر ماندگاری ١٤ روزه تخمک‌ها پس از اوولاسیون در حفره شکمی مطابقت دارد (Azuma *et al.*, 2003). هر چند عکس یافته‌های Sakai *et al.*, (1975) و Yamazaki *et al.*, (1989) در قزل‌آلای رنگین کمان و Rizzo *et al.*, (2003) بر روی گونه *Prochilodus marggravii* است که بیان کننده افزایش درصد ناهنجاری لاروی با افزایش ماندگاری تخمک می‌باشد. مطالعه Aegerter and Jalabert (2004) در قزل‌آلای رنگین کمان نیز بیان کننده تغییرات معنی‌دار درصد ناهنجاری لاروی در دماهای ۱۲ و ۱۷ درجه سانتی‌گراد است. همچنین در ماهی آزاد دریای خزر، درصد ناهنجاری لاروی تنها با درصد چشم‌زدگی رابطه معنی‌دار داشت و ارتباط آن با درصد تفریخ ضعیف بود که با بخشی از یافته‌های Aegerter and Jalabert (2004) در مورد ارتباط ضعیف درصد ناهنجاری لاروی با درصد چشم‌زدگی و تفریخ در قزل‌آلای رنگین کمان مطابقت دارد.

در مایع تخمدانی ماهی آزاد دریای خزر با ایجاد فوق رسیدگی، pH به شدت کاهش یافت و مقدار گلوکز، کلسترول، پروتئین، کلسیم، آهن و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز افزایش یافت. در حالی که در مقدار تری‌گلیسیرید تغییر چندانی حاصل نشد. این اولین گزارش در مورد تغییرات غلظت گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسیرید، آهن و کلسیم در مایع تخمدانی در اثر فوق رسیدگی بود که می‌تواند با نتایج تحقیقاتی که در آینده در این ارتباط صورت می‌گیرد مورد مقایسه قرار گیرد. همچنین این نتایج تا حد زیادی با مطالعات Lahnsteiner (2000) که با ایجاد فوق رسیدگی تا ۲۱ روز پس از اوولاسیون در قزل‌آلای رنگین کمان، متوجه کاهش pH مایع تخمدانی و افزایش مقدار پروتئین و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز گردید، مطابقت دارد. در حالی که در مطالعه Aegerter and Jalabert (2004) بر روی همین گونه، غلظت پروتئین مایع تخمدانی در $17^{\circ}C$ در اثر فوق رسیدگی ثابت ماند و تنها در $12^{\circ}C$، افزایش در غلظت مایع تخمدانی مشاهده شد. همچنین نتایج این تحقیق یافته‌های Feuvel *et al.*, (1993) در ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*) و Aegerter and Jalabert (2004) در قزل‌آلای رنگین کمان در مورد کاهش pH مایع تخمدانی در اثر فوق رسیدگی را تایید نمود. منشاء ترکیبات موجود در مایع تخمدانی

می‌تواند فعالیت‌های سنتتیکی و ترشحی سلول‌های اپیتلیومی تخمدان و یا ناشی از تجزیه تخمک باشد. تحقیقات Lahnsteiner *et al.*, (1997) در ماهی بلیک (*Alburnus alburnus*)، نشان دهنده نقش لایه اپیتلیومی تخمدان در ترشح ترکیباتی نظیر گلوکز، پروتئین‌ها، آنزیم‌های اسید فسفاتاز، پروتئاز و β-D گلوکورونیداز در مایع تخمدانی است که سبب ایجاد یک شیب یونی در آن می‌شود. همچنین در آزاد ماهیان مایع تخمدانی حاوی یون‌های Na^+، K^+ و Ca^{2+} و گلوکز، فروکتوز، کلسترول، فسفولیپیدها، پروتئین‌ها و آمینواسیدهای آزاد است (Satia *et al.*, 1974; Lahnsteiner *et al.*, 1995). از طرفی مطالعات نشان داده است که در طول فوق رسیدگی، از ۹ نوع پروتئینی که در مایع تخمدانی قزل‌آلای رنگین کمان یافت شده، ۳ تای آنها در تخمک ماهی نیز به مقدار زیاد وجود داشته است (Lahnsteiner, 2000). در واقع با این که برخی از ترکیبات پروتئینی مایع تخمدانی از خون حاصل می‌شود (Matsubara, *et al.*, 1985, 1987) اما اکثر آنها در اثر فعالیت ترشحی تخمدان پس از اوولاسیون تولید می‌شوند که وارد حفره شکمی آزاد ماهیان می‌شوند (Rime *et al.*, 2004).

در این مطالعه با افزایش مقدار پروتئین و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز در مایع تخمدانی در طول فوق رسیدگی، pH به شدت کاهش یافت. همچنین ارتباط معنی‌دار مثبت بین مقدار پروتئین و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز ($P<۰/۰۵$ و $r=۰/۸۷۱$) مشاهده شد. احتمالاً پروتئین‌ها و آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز که در اثر دژنره شدن تخمک به مایع تخمدانی رها شدند سبب کاهش شدید pH مایع تخمدانی گردیدند. ارتباط منفی بین غلظت پروتئین مایع تخمدانی و pH در ماهی توربوت (Fauvel *et al.*, 1993) و قزل‌آلای رنگین کمان (Lahnsteiner, 2000) و همچنین ارتباط منفی بین فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و pH در قزل‌آلای رنگین کمان هم گزارش شده است (Lahnsteiner, 2000).

از بین فاکتورهای مورد بررسی در مایع تخمدانی ماهی آزاد دریای خزر، بین مقدار گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسیرید، پروتئین، کلسیم، آهن، فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز و pH با درصد چشم‌زدگی، تفریخ و ناهنجاری لاروی رابطه معنی‌دار برقرار بود. ارتباط بین pH، پروتئین و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز مایع تخمدانی با درصد چشم زدگی در تخمک قزل‌آلای رنگین کمان (Lahnsteiner, 2000) و pH مایع تخمدانی و درصد لقاح در ماهی توربوت (Fauvel *et al.*, 1993) قبلاً گزارش شده بود. در حالی که در مطالعه Aegerter and Jalabert (2004)، تنها بین pH مایع تخمدانی و درصد چشم‌زدگی رابطه معنی‌دار وجود داشت و ارتباطی بین مقدار پروتئین و کیفیت تخمک گزارش نشده است. pH مایع تخمدانی

از طریق تاثیر بر پتانسیل دیواره تخمک و تبادلات بین تخمک و مایع تخمدانی، مستقیماً بر کیفیت آن موثر است (Lahnsteiner *et al.*, 1999) و در تمام مطالعات انجام شده تاکنون از جمله تحقیق حاضر، کاهش pH به ویژه به مقدار کمتر از ۸، با کاهش چشمگیر کیفیت تخمک همراه بوده است. به طوری که در ماهی آزاد دریای خزر، با کاهش آن از ۸/۳۲ به ۷/۷۲، درصد چشم زدگی و تفریخ به ترتیب از ۹۰/٦۵ و ۸٦/۳۳ درصد به ۰/٦۷ و ۰/٤۹ درصد کاهش یافت. همچنین به دلیل ارتباطی که بین پروتئین و pH مایع تخمدانی وجود داشت ($P<0/05$ و $r=-0/898$) به نظر می‌رسد که پروتئین از طریق تاثیر بر pH بر کیفیت تخمک موثر است. در حالی که آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز که یک آنزیم محلول در سیتوپلاسم است می‌تواند از تخمک‌های آسیب دیده به بیرون تراوش کند (Lahnsteiner *et al.*, 1999).

از بین فاکتورهای بیوشیمیایی آنالیز شده در تخمک ماهی آزاد دریای خزر، تنها مقدار پروتئین و تری‌گلیسیرید در طول فوق رسیدگی به ازای هر تخمک تغییر کرد و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز هم در تخمک و هم در هر میلی‌گرم از آن افزایش یافت و سایر فاکتورها ثابت ماندند. این اولین گزارش در مورد تغییرات غلظت گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید در تخمک در اثر فوق رسیدگی بود. اگرچه بر خلاف نتایج Craik and Harvey (1984) بر روی قزل‌آلای رنگین کمان که بیان کننده افزایش مقدار آهن و کلسیم در تخمک‌های فوق رسیده بود، در این مطالعه مقدار این دو فاکتور در اثر فوق رسیدگی تغییر چندانی نکرد، البته به دلیل تعداد کم مولد در مطالعه Craik and Harvey (1984) نتایج آن نمی‌تواند عمومیت داشته باشد. به هر حال نتایج این تحقیق با نتایج حاصله توسط Lahnsteiner (2000) در مورد ثابت ماندن مقدار پروتئین و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز تخمک قزل‌آلای رنگین‌کمان مغایرت دارد.

در ماهیان زرده از جنس گلیکوفسفولیپوپروتئین با وزن زیاد است که توسط سلول‌های کبد در مولدین سنتز می‌شود، به جریان خون ترشح شده و توسط اووسیت‌های در حال رشد جذب می‌شود و به پروتئین‌های زرده تبدیل می‌شود (Rime *et al.*, 2004). در آزاد ماهیان پروتئین‌های زرده که حاصل وتیلوژنین است، ۸۰ تا ۹۰ درصد وزن خشک تخمک‌های اوولیه شده را تشکیل می‌دهند (Mommsen and Moon, 2005). در آنالیز تخمک ماهی آزاد دریای خزر نیز پروتئین بیشترین درصد از وزن تخمک را تشکیل می‌داد و از بین چربی‌ها نیز مقدار تری‌گلیسیرید بیشتر از کلسترول بود. بررسی تخمک قزل‌آلای رنگین کمان نیز نشان داد که تری‌گلیسیریدها به همراه فسفاتیدیل کولین اصلی‌ترین نوع چربی‌ها بوده و کلسترول و اسیدهای چرب آزاد در مقدار کمتر وجود دارند (Lahnsteiner, 2000).

در این تحقیق درصد چشم‌زدگی و تفریخ و ناهنجاری لاروی تنها با مقدار کلسترول، تری‌گلیسیرید، آهن و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز تخمک رابطه داشت. ارتباط بین میزان آهن تخمک و درصد تفریخ در قزل‌آلای رنگین کمان قبلاً توسط Hirao (1954) گزارش شده بود. در حالی که مطالعه Lahnsteiner (2000) هیچ ارتباطی را بین فاکتورهای بیوشیمیایی مورد بررسی در تخمک و کیفیت آن گزارش ننموده است.

بررسی ساختاری تخمک در اثر فوق رسیدگی توسط میکروسکوپ نوری نشان داد که قطر کوریون و کورتیکال وزیکول‌ها در تخمک‌های تازه اوله شده و فوق رسیده تفاوت چندانی نداشت بلکه بیشترین تغییر در قطر فضای پری‌ویتلین و زرده مشاهده شد. زرده در تخمک‌های فوق رسیده ناهمگن گشته و محتوی وزیکول‌های فراوانی شد که از پلی ساکارید اسیدها و لیپیدها تشکیل شده و در اثر فرآیندهای کاتابولیکی و تجزیه‌ای ایجاد می‌شوند (Lahnsteiner, 2000). نامنظم بودن قطر فضای پری‌وتیلین می‌تواند به دلیل به هم خوردن تعادل اسمزی بین تخمک و مایع تخمدانی باشد (Lahnsteiner, 2000). یافته‌های بافت شناسی این تحقیق مشابه نتایج Lahnsteiner (2000) بر روی تخمک قزل‌آلای رنگین کمان می‌باشد. اگرچه با نتایج حاصل از مطالعات Formacion *et al.*, (1993) بر روی تخمک ماهی حوض و Rizzo *et al.*, (2003) بر روی تخمک *Prochilodus marggravii* متفاوت است. در ماهی حوض با ایجاد فوق رسیدگی قطر کوریون کاهش یافت و در گونه *Prochilodus marggravii* نیز تغییری در ساختار تخمک در اثر فوق رسیدگی ایجاد نشد.

همچنین در ماهی آزاد دریای خزر سوراخ میکروپیل در تخمک‌های فوق رسیده باز بود که مشابه یافته‌های Rizzo *et al.*, (2003) بر روی گونه *Prochilodus marggravii* می‌باشد. بسته نشدن سوراخ میکروپیل بیان کننده این مطلب است که سوراخ میکروپیل دلیل کاهش کیفیت تخمک در اثر فوق رسیدگی نمی‌باشد و این کاهش کیفیت را می‌توان به تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی که به دلیل شکستگی پروتئین‌های زرده، از دست دادن مولکول‌های آلی کوچک از طریق جداره تخمک و دفسفریلاسیون پروتئین‌ها و چربی‌ها حاصل می‌شود، نسبت داد (Rizzo *et al.*, 2003).

در یک نتیجه‌گیری کلی از این تحقیق می‌توان بیان داشت، که بهترین زمان استحصال تخمک پس از اوولاسیون در ماهی آزاد دریای خزر در دمای $^{\circ}C$ ۰/۶±۷ تا ۱۰ روز پس از اوولاسیون می‌باشد. به علاوه می‌توان از فاکتورهای گلوکز، کلسترول، تری گلیسیرید، پروتئین، کلسیم، آهن و pH مایع تخمدانی، کلسترول، تری‌گلیسیرید و آهن تخمک و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز هم در تخمک و هم در مایع تخمدانی به عنوان نشانگر جهت پیش‌بینی کیفیت تخمک این گونه استفاده کرد. هر چند به دلیل تغییرات زیادی که در فاکتورهای بیوشیمیایی تخمک وجود داشت، مایع تخمدانی برای این منظور مناسب‌تر است.

پیشنهادات

– با توجه به این که تخمک‌های ماهی آزاد دریای خزر تا ۱۰ روز پس از اوولاسیون همچنان از کیفیت بالایی برخوردارند، پیشنهاد می‌شود به منظور کاهش استرس ناشی از دستکاری متوالی مولدها و همچنین تولید تخم‌های با کیفیت بالا، فواصل ۱۰ روزه برای بررسی وقوع اوولاسیون در مولدها در نظر گرفته شود.

– از بین پارامترهایی که بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق می‌توانند به عنوان نشانگر جهت پیش‌بینی کیفیت تخمک مطرح باشند، به نظر می‌رسد pH مایع تخمدانی از بعد عملی کاملاً در مرکز قابل استفاده است. زیرا بر خلاف سایر پارامترها که نیاز به آنالیز دارند، pH مایع تخمدانی به سادگی قابل اندازه‌گیری است.

– از آنجا که مدت زمان لازم برای ایجاد پدیده فوق رسیدگی تخمک مستقیماً تحت تاثیر دمای آب قرار دارد، پیشنهاد می‌شود مطالعه مزبور در دماهای مختلف آب انجام شود تا آستانه افت کیفیت تخمک در آن دماها نیز تعیین شود.

– علی‌رغم آن که نرخ چشم‌زدگی، تفریخ و ناهنجاری لاروی، با توسعه موفقیت‌آمیز مراحل لاروی رابطه مثبت و قابل ملاحظه‌ای دارند، با این وجود پیشنهاد می‌شود این مطالعه در مراحل پس از تفریخ نیز ادامه یابد.

– در طرح مزبور تنها برخی از پارامترهای بیوشیمیایی تخمک و مایع تخمدانی جهت معرفی نشانگرهای کیفیت تخمک مورد آزمایش قرار گرفتند. استفاده از سایر پارامترها مانند ATP، اسیدهای چرب استری شده و غیر استری شده، اسمولالیته و... می‌تواند اطلاعات کامل‌تری را در این زمینه فراهم آورد.

پیوست

مراحل هیستوتکنیک به روش پارافینه کردن

روش پارافینه کردن Paraffinization

یکی از روش‌های معمول در تهیه برش‌های بافت‌شناسی روش پارافین است که شامل مراحل زیر می‌باشد: (پوستی و ادیب مرادی، ۱۳۸۵)

۱. آبگیری، شفاف‌سازی و آغشتگی با پارافین
۲. قالب‌گیری
۳. برش بافت
٤. چسباندن برش‌ها بر روی لام
۵. رنگ‌آمیزی

۱. آبگیری[1]، شفاف‌سازی[2] و آغشتگی با پارافین[3]

۱- قرار دادن نمونه در اتانل ۸۰ درجه	۳۰ دقیقه
۲- قرار دادن نمونه در اتانل ۹٦ درجه	۳۰ دقیقه
۳- قرار دادن نمونه در اتانل ۱۰۰ درجه	٦۰ دقیقه
٤- قرار دادن نمونه در اتانل ۱۰۰ درجه	۱۸۰ دقیقه
۵- قرار دادن نمونه در اتانل ۱۰۰ درجه	۱۸۰ دقیقه
٦- قرار دادن نمونه در اتانل ۱۰۰ درجه	۱۸۰ دقیقه
۷- قرار دادن نمونه در گزیلل	۳۰ دقیقه
۸- قرار دادن نمونه در گزیلل	۳۰ دقیقه
۹- گزیلل- پارافین خالص (به نسبت مساوی)	٦۰ دقیقه
۱۰- پارافین خالص	٦۰ دقیقه
۱۱- پارافین خالص	٦۰ دقیقه
۱۲- پارافین خالص	۳۰ دقیقه

۲. قالب‌گیری[4]

برای نگهداری نمونه‌ها و سادگی برش، آنها را در توده‌های پارافینی قرار دادیم. برای قالب‌گیری از دو

[1] - Dehydration
[2] - Clearing
[3] - Embeding
[4] - Blocking

قطعه فلز L شکل آلومینیومی که بر روی یک سطح شیشه‌ای قرار داده شدند، استفاده شد. پس از سرد و سخت شدن پارافین به طریقی که کمترین صدمه به توده پارافین حاوی بافت وارد گردد از قالب جدا شدند و در یخچال قرار داده شدند.

۳. برش بافت[1]

با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۵-۲ میکرون تهیه شد (Lahnsteiner, 2000). برش‌های طولی از بلوک‌های حاوی نمونه به صورت برش ممتد[2] تهیه گردید. برش‌های تهیه شده در آب بن ماری با درجه حرارت متعادل (حدود $^{\circ}C$ ٤٥) قرار داده شدند تا چروک‌های برش‌ها برطرف گردد.

٤. چسباندن برش‌ها بر روی لام[3]

در این مرحله سطح لام‌ها توسط مخلوط سفیده تخم‌مرغ و گلیسیرین به نسبت مساوی آغشته شد. پس از آن برش‌ها از سطح آب با فرو بردن لام با زاویه ٤٥ درجه بر روی آنها منتقل شده و سپس شماره نمونه توسط قلم الماس بر روی لام حک گردید. پس از آن لام‌ها برای خشک کردن و نگهداری تا زمان رنگ‌آمیزی در انکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

۵. رنگ‌آمیزی[4]

در این تحقیق از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین (H & E) استفاده شد (پوستی و ادیب مرادی، ۱۳۸۵).

برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، مراحل زیر اجرا گردید:

۱. قرار دادن نمونه در گزیلل به مدت ۵ دقیقه
۲. قرار دادن نمونه در گزیلل به مدت ۵ دقیقه
۳. قرار دادن نمونه در گزیلل به مدت ۵ دقیقه
٤. قرار دادن نمونه در اتانل ۱۰۰ به مدت ۵ دقیقه
۵. قرار دادن نمونه در اتانل ۹٦ به مدت ۵ دقیقه

---

[1] - Sectioning
[2] - Serial section
[3] - Mounting
[4] - Staining

٦. قرار دادن نمونه در اتانل ۹٦ به مدت ۵ دقیقه
۷. قرار دادن نمونه در اتانل ۷۰ به مدت ۵ دقیقه
۸. شستشو نمونه در آب جاری به مدت ۲-۱ دقیقه
۹. قرار دادن نمونه در هماتوکسیلین به مدت ۳۰ دقیقه
۱۰. شستشو نمونه در آب جاری به مدت ۲-۱ دقیقه
۱۱. عبور دادن نمونه از اسید الکل ۱ درصد (۹۹ سی‌سی الکل ۷۰ درصد و ۱ سی‌سی اسید کلریدریک یک نرمال) با یک حرکت سریع
۱۲. شستشو نمونه در آب جاری به مدت ۲-۱ دقیقه
۱۳. قرار دادن نمونه در کربنات لیتیم به مدت ۱ دقیقه
۱٤. شستشو نمونه در آب جاری به مدت ۲-۱ دقیقه
۱۵. شستشو نمونه در ائوزین به مدت ۲۰ دقیقه
۱٦. عبور دادن نمونه از الکل‌های با درجات ۷۰، ۹٦، ۹٦، ۱۰۰ درجه هر یک به تعداد ۲ حرکت
۱۷. قرار دادن نمونه در گزیلل به مدت ۱۰ ثانیه
۱۸. قرار دادن نمونه در گزیلل به مدت ۱۰ ثانیه
۱۹. قرار دادن نمونه در گزیلل به مدت ۱۰ ثانیه

نتیجه رنگ‌آمیزی

در این روش، سیتوپلاسم و سایر سلول‌ها، صورتی رنگ و هسته، آبی رنگ می‌شود.

پس از قرار دادن قطره‌ای چسب انتلان (Merck) بر روی برش رنگ‌آمیزی شده، لامل را با زاویه ٤۵ درجه بر روی آن قرار دادیم به طوری که حباب هوا بین لام و لامل به وجود نیاید. بعد از مطالعه توسط میکروسکوپ نوری فتومیکروگراف‌هایی از نمونه‌ها تهیه شد.

منـــابع

۱. بهرامیان، ب. ۱۳۸۰. نقش اداره کل تکثیر و بازسازی ذخایر و اهمیت فزاینده مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت در حفظ و افزایش ماهی آزاد حوزه جنوبی دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)، شیلات استان مازندران. ۵۹ صفحه.

۲. پوستی، ا. و م. ادیب مرادی، ۱۳۸۵. روش‌های آزمایشگاهی بافت‌شناسی، انتشارات دانشگاه تهران. ۲۸۰ صفحه.

3. Aegerter, S. and B. Jalabert. 2004. Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, (*Oncorhynchus.mykiss*) Aquaculture, 231: 59-11.

4. Artiss, J.D. and B. Zak. 1997. Measurement of cholesterol concentration. In: Rifai, N., Warnick, G. R., Dominiczak, M.H., Handbook of lipoprotein testing, Washington: AACC Press. 99-114.

5. Azuma, T., H. Ohta, S. Oda, K. Muta, T. Rada and T. Unuma. 2003. Changes in fertility of rainbow trout eggs retained in coelom. Fisheries science, 69:131-136.

6. Bagliniere, J. L., G. Maisse and A. Nihouaran. 1990. Migratory and reproductive behaviour of female adult Atlantic salmon (*salmo salar*) in a spawning stream. Journal of fish Biology, 36: 511-520.

7. Barlaup, B. T., H. Lura, H. Saegrov and R.C. Sundt. 1994. Interaspecific variability in female salmonid spawning behaviour. Canadian Journal of zoology, 72: 636-642.

8. Bauer, P.J. 1981. Affinity and stoichiometry of calcium binding by Arsenazo. Journal of Analytical Biochemistry, 110: 61-72.

9. Bergmeyer, H. U., M. Horder and R. Rej. 1986. Approved recommendation on IFCC method for the measurement of catalytic concentration of enzymes, Part 2. IFCC method for aspartate amino transferase. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 24: 497-510.

10. Billard, R. and C. Gillet. 1981. Ageing of eggs and temperature potentialization of micropollutant effects of the aquatic medium on trout gamets, Cah.Lab Hydrobiol. Montreau, 12: 35-42.

11. Bonnet, E., B. Jalabert and J. Bobe. 2003. A three day in vitro storage of rainbw trout unfertilized eggs in coelomic fluid at 12ºC doesnot affect development success. Cybium, 27: 47-51.

12. Boulekbache, H., J. Bastin, M. Andriamihaja, M. Lefebvre and C. Joly. 1989. Ageing of fish oocytes; effects on adenylic nucleotides content, energy change and viability of carp embryo. Comparative Biochemistry, 93:471-476.

13. Breton, B., M. Govoroun and T. Mikolajczyk. 1998. GTHI and GTHII secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: relationship with pituitary responsiveness to GnRH-a stimulation. General and Comparative Endocrinology, 111: 38-50.

14. Bromage, N., J. Jones, C. Randall, M. Thrush, B. Davies, J. Springate, J. Duston and G. Baker. 1992. Brood stock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout. Aquaculture, 100:141-166.

15. Bry, C. 1981. Temporal aspect of macroscopic changes in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, oocytes before ovulation and of ova fertility during the post-ovulation period; effect of treatment with 17α-hydroxy - 20β-dihydroxy progesterone. Aquaculture, 24: 153-160.

16. Burtis, C.A. and E. R. Ashwood. 1996. Tietz fundamentals of clinical chemistry. Fourth edition. W.B. Saunders, pp:362-363.

17. Coffman, M.A. and F. W. Goetz. 1998. Trout ovulatory proteins are partially responsible for the ani-proteolytic activity founding trout coelomic fluid. Biology of Reproduction, 59: 497-502.

18. Craik, J. C. A. and S. M. Harvey. 1984. Biochemical changes associated with overripening of the eggs of rainbow trout, (*salmo gairdneri*) Aquaculture, 37:347-357.

19. Crisp, D. T. and P. A. Carling. 1989. Observation on siting, dimensions and structure of salmonid redds. Journal of Fish Biology, 34:119-134.

20. Dumont, J. N. and A. R. Brummett. 1980. The vitelline envelope, chorion, and micropyle of *Fundulus heteroclitus* eggs. Gamete Research, 3: 25-44.

21. Escaffre, A. M. and R. Billard. 1979. Changes in fertilizability of rainbow trout eggs left in the abdominal cavity during the past ovulatory period. Bull. Fr. Piscic, 272: 56-70.

22. Evans, D. H. and Claiborne, J. B., 2005. The physiology of fishes. Taylor and Francis group, Boca Roton London, New York. pp: 351-359.

23. Fauvel, C., M. H. Omnes, M. Suquet and Y. Normant. 1993. Reliable assessment of overripening in turbot (*Scophthalmus maximus*) by a simple pH measurement, Aquaculture, 117:101-113.

24. Formacion, M.J., R. Hori and T.J. Lam. 1992. Overripening of ovulated eggs in gold fish, Morphological changes, Aquaculture, 114:155-168.

25. Gaudemar, B. DE and E. Beall. 1998. Effects of overripenig on spawning behaviour and reproductive success of Atlantic salmon females spawning in a controlled flow channel. Journal of Fish Biology, 53:434-446.

26. Hirao, S., J. Yamada and R. Kikuchi. 1954. Relation between biochemical constituents of rainbow trout eggs and hatching rate. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 21: 240-243.

27. Hirose, K., R. Ishida and K. Sakai. 1977. Induced ovulation of ayu using Human chorionic Gonadotropin (HCG) with special refrence to changes in several characteristics of eggs retained in the body cavity after ovulation. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 43: 409-416.

28. Janz, D. M. and G. V. D. Kraak. 1997. Suppression of apoptosis by gonadotropin, 17β-Estradiol, and epidermal growth factor in rainbow trout pre-ovulatory ovarian follicles. General and Comparative Endocrinology, 105:186-193.

29. King, H.R. and N. W. Pankhurst. 2004. Effect of maintenance at elevated temperature on ovulation and luteinizing hormone releasing hormone analogue responsiveness of female Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Tasmania. Aquaculture, 233:583-597.

30. Hoar, W. S., D. J. Randall and E. M. Donaldson. 1983. Fish physiology. Volume IX, Part A. Harcourt Brace Jovanovich Publishers, pp: 223-263.

31. Lahnsteiner, F. and P. Patarnello. 2004. Egg quality determination in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) with biochemical parameters. Aquaculture, 237: 443-459.

32. Lahnsteiner, F. 2000. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the overripening of rainbow trout eggs. Fish Physiology and Biochemistry, 23:107-118.

33. Lahnsteiner, F., B. Urbanyi, A. Horvath and T. Weismann. 2000. Bio-markers for egg quality determination in cyprinid fish. Aquaculture, 195:331-352.

34. Lahnsteiner, F., T. Weismann and R. A. Patzer. 1995. Composition of the ovarion fluid in 4 salmonid species: *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta lacustris*, *Salvelinus alpinus* and *Hucho hucho*. Reproduction Nutrition Development, 35: 465-474.

35. Lahnsteiner, F., T. Weismann and R. A. Patzner. 1997. Structure and Function of the ovarian cavity and oviduct and composition of the ovarian fluid in the bleak, *Alburnus alburnus* (Teleostei, Cyprinidae). Journal of Tissue and Cell, 29: 305-314.

36. Lahnsteiner, F., T. Weismann and R. Patzner. 1999. Physiological and biochemical parameters for egg quality determination in lake trout (*Salmo trutta Lacustris*). Fish Physiology and Biochemistry, 20: 375-388.

37. Lam, T. J., Y. Nagahama, K. Chan and W. S. Hoar. 1978. Overripe eggs and post-ovulatory corpora lutea in the three spined stickleback. Canadian Journal of Zoology, 50: 2029-2036.

38. Liley, N. R., A. Fostier and E. S. P. Breton Tan. 1986. Endocrine changes associated with spawning behavior and social stimuli in a wild population of rainbow trout. General and Comparative Endocrinology, 62: 157-167.

39. Manzer, J. L. and I. Miki. 1986. Fecundity and egg retention of some sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stocks in British Columbia. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 43:1643-1655.

40. Matsubara, T., A. Hara and K. Takano. 1985. Immunochemical identification and purification of coelomic fluid-specific protein in chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Comparative Biochemistry and Physiology, 81: 309-314.

41. Matsubara, T., F. Ito, H. Hara and K. Takano. 1987. Edema-like protuberances found on the inner surface of coelomic wall of matured masu salmon, *Oncorhynchus masu*, with special reference to the coelomic fluid production. Bull Fac Fish Hokkaido Univ. 38: 349-357.

42. Mcpheron, R.A. and M. R. Pincus. 2007. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. Twenty first edition, W.B. Saunders. 1395p.

43. Mohagheghi Samarin, A., M. R. Ahmadi. T. Azuma, Gh. R. Rafiee, B. Mojazi Amiri and M. R. Naghavi. 2008. Influence of the time to egg stripping on eyeing and hatching rates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Under cold temperatures. Aquaculture, 278: 195-198.

44. Mollah, M. F. A. and E. S. P. Tan. 1983. Viability of catfish eggs fertilized at varying post-ovulation times. Journal of Fish Biology, 22: 563-566.

45. Mommsen, T.P. and T. W. Moon. 2005. Environmental toxicology. Elsevier B. V., P. 435.

46. Nomura, M., K. Sakai and F. Takashima. 1974. The over-ripening phenomenon of rainbow trout. I. Temporal morphological changes of eggs retained in the body cavity after ovulation. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 40:977-984.

47. Pankhurst, N. W, G. J. Purser, G. V. D. Kraak, P. M. Thomas and G. N. R. Forteath. 1996. Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovarian steroid genesis in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 146: 277-290.

48. Pankhurst, N.W. and P. M. Thomas. 1998. Maintenance at elevated temperature delays the steroidogenic and ovulatory responsiveness of rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) to Luteinizing hormone releasing hormone analogue. Aquaculturs, 166:163-177.

49. Peter, R. E. 1981. Gonadotropin secretion during reproductive cycles in teleosts: influences of environmental factors. General and Comparative Endocrinology. 45:294-305.

50. Rime, H., N. Guitton, C. Pineau, E. Bonnet, J. Bobe and B. Jalabert. 2004. Post-Ovulatory ageing and egg quality: A proteomic analysis of rainbow trout coelomic fluid. Reproductive Biology and Endocrionlogy, 2:26.

51. Rizzo, E., H. P. Godinho and Y. Sato. 2003. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marggravii*. Theriogenology, 60: 1059-1070.

52. Sakai, K., M. Nomura, F. Takashima and H. Oto. 1975. The overripening of rainbow trout, changes in the percentage of eyed eggs. Hatching rate and incidence of abnormal alevins during the process of over ripening. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 41: 855-850.

53. Satia, B.P., L. R. Donalson, L. S. Smith and J. N. Nightingale. 1974. Compositon of ovarian fluid and eggs of the university of Washington strain of rainbow trout, (*Salmo gairdneri*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 31:1796-1799.

54. Schreck C. B. and P. B. Moyle. 1990. Methods for fish Biology. Bethesda, Md. USA: American Fisheries society: 529-547.

55. Scott, A. P., D. S. Mackenzie and N. E. Stacey. 1984. Endocrine changes during natural spawning in the white sucker, *Catostomus commersoni*. General and Comparative Endocrinology, 56:349-359.

56. Scott, A. P., J. P. Sumpter and P. A. Hardiman. 1983. Hormone changes during ovulation in the rainbow trout, (*Salmo gairdneri*). General and Comparative Endocrinology, 49:128-134.

57. Springate, J.R.C., N. R. Bromage, J. A. K. Elliott and D. L. Hudson. 1984. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eyeing, hatch and swim-up in the rainbow trout, (*Salmo gairdneri*). Aquaculture, 43: 313-322.

58. Tietz, N. W. 1986. Textbook of clinical chemistry. W.B. Saunders, pp:583-584 and 888-889.

59. Weil, C. and O. Marcuzzi. 1990. Cultured pituitary cell GTH response to GnRH at defferent stages of rainbow trout oogenesis. Endocrinology, 79:483-491.

60. Wending, N. C., N. C. Bencic, J. J. Nagler, J. C. Cloud and R. L. Ingermann. 2000. Adenosine triphosphate levels of Chinook salmon (*oncorhynchus tshawitsha*) eggs following in vitro maintenance and activation/ fertilization. Fish Physiology and Biochemistry, 22: 217-223.

61. Whilloughby, S. 1999. Salmonid farming. Fishing Newsbook, 329p.

62. Yamazaki, F., J. Goodier and K. Yamano. 1989. Chromosomal aberrations caused by ageing and hybridization in charr, masu salmon and related salmonids. Physiol. Ecol. Jpn. Spec. 1: 529-542.

Physiological and biochemical study of over-ripened oocyte in the cultivated Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) and determination of egg quality markers

Abstract

To determine the best time for egg stripping after ovulation and over-ripened oocyte in the Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*), the eggs were retained in the parental abdominal cavity for 40 days post-ovulation (DPO) at 7±0.6°C. Eggs were stripped every 10-day interval in 4 treatment and were fertilized with a pool of semen obtained from 8 males. Also, the physiology and biochemistry of the eggs and ovarian fluids were studied. Results showed that the level of eyed eggs and hatched alevins declined with over-ripening time: that is, the expected amounts (90.65 ± 6.28% for eyeing and 86.33 ± 6.82% for hatching) in newly ovulated eggs (0–10 DPO) decreased to 0.67 ± 1.34% and 0.49 ± 0.98%, respectively, in over-ripened eggs (30–40 DPO). However, larval abnormalities remained constant for 30-days after ovulation. During the course of oocyte over-ripening, the pH of the ovarian fluid significantly decreased and the concentration of glucose, protein, calcium, iron, and aspartate aminotransferase activity significantly increased. Moreover, the concentration of protein, triglycerides, and aspartate aminotransferase activity in the eggs also changed. In the newly ovulated egg, the yolk consisted of homogenous tissue and its perivitelline space diameter had no considerable differences. With over-ripening, the yolk became heterogeneous, while chorion diameter and micropyle did not change. The perivitelline space diameter varied among different areas. The present study demonstrated that the best time to take Caspian brown trout eggs after ovulation at 7± 0.6°C was up to 10 DPO. Among the studied parameters of the egg and ovarian fluid, egg quality was related to both ovarian fluid parameters (e.g., pH, protein, aspartate aminotransferase, glucose, cholesterol, triglycerides, calcium, iron) and egg parameters (e.g., cholesterol, triglycerides, iron, aspartate aminotransferase). Thus, these parameters can be used as a egg quality markers in this species.

Keywords: oocyte, ovulation, over-ripening, ovarian fluid, Caspian brown trout

By: Masoumeh Bahre Kazemi

Islamic Azad University
Science and Research Branch

Physiological and biochemical study of over-ripened oocyte in the cultivated Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) and determination of egg quality markers

By:
Masoumeh Bahr Kazemi

Under Supervision of:
Dr. A. Matinfar
Dr. M. Soltani

Advisor:
Dr. B. Abtahi
Dr. I. Pousti

A thesis submitted to the Graduate Studies Office
in the degree of ***Ph.D.*** in

Fisheries Science

November 2009