مجله علوم وفنون دریایی، فصل نامه ی علمی پژوهشی

دوره ۲۰، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰، صفحات ۱۰۷ تا ۱۱۸

مقاله پژوهشی

Available Online: *http://jmst.kmsu.ac.ir*

بررسی برخی خصوصیات کیفی و ریخت شناسی اسپرم میگوی پا سفید غربی(*Litopenaeus vanamei*) در استان خوزستان

مجتبی علیشاهی *، محمد مهدی حق پرست رادمرد، مریم شکوهمند، فرید براتی،

گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

*** نویسنده مسئول، پست الکترونیک:** alishahim@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۷/۰۸ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۵/۰۶/۰۹

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22113/JMST.2016.32081

چکیده

با توجه به توسعه پرورش میگوی سفید غربی(*Litopenaeus vanamei*) در کشور و نیاز به تحقیق در مورد تکثیر این گونه، بررسی بیولوژی تولید مثل و خصوصیات جنسی این گونه ارزش زیادی دارد. لذا در این تحقیق ویژگی‌های ریخت شناسی اسپرم میگوی سفید غربی با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست، تکنیک Atomic Force Microscopy و میکروسکوپ الکترونی بررسی گردید، همچنین وزن بیضه و اسپرماتوفور، تراکم و زنده مانی اسپرم این میگو نیز بررسی شده و همبستگی بین شاخص های اندازه گیری شده ارزیابی گردید. به این منظور در فصل تکثیر ۲۰ عدد میگوی نر بالغ رسیده (وزن ۳۵/۳۷±۴/۳ گرم) از یکی از کارگاه های تکثیر استان خوزستان به آزمایشگاه منتقل شده و بعد از بررسی های بهداشتی و بیومتری، وزن اسپرماتوفور، وزن بیضه، اندازه اسپرم و وضعیت اسپرم‌های غیر طبیعی و ملانیزاسیون اسپرماتوفور بررسی گردید. همبستگی بین شاخص‌های مودر بررسی نیز ارزیابی گردید. همچنین از اسپرم نمونه مناسب برای میکروسکوپ الکترونی و AFM تهیه شده و ریز ساختار اسپرم میگو در این دو روش بررسی گردید. نتایج نشان داد وزن بیضه و وزن اسپرماتوفور و نسبت اسپرماتوفورهای ملانیزه شده به ترتیب برابر ۰/۰۱ ± ۰/۱۸ گرم، ۰/۰۱ ± ۰/۰۸گرم و۱/۵۰ ± ۱۵/۵۶ درصد بود. همچنین تعداد اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده و قطر اسپرم‌ها به ترتیب برابر ۳/۸۳ ± ۴۱/۱۹ در میکرولیتر، ۲/۳۹ ± ۶۹/۶۹ درصد و ۱۰/۸ ± ۳۹/۳۶ میکرومتر بود. بیشترین همبستگی بین شاخص‌های مورد بررسی بین وزن میگو و وزن بیضه (R=0.958)، مساحت اسپرم (R=0.91)، تعداد اسپرم (R=0.766)، و درصد بقا اسپرم (R=0.716) مشاهده شد. هرچند ارتباط معنی داری بین نسبت اسپرم‌های غیر طبیعی و همچنین میزان ملانیزه شدن اسپرماتوفور با سایر شاخص های مورد بررسی وجود نداشت. بطور کلی شباهت بالایی بین مشخصات تولید مثلی میگوی نر وانامی در شرایط استان خوزستان با مشخصات گزارش شده در سایر نقاط دنیا مشاهده گردید.

واژگان کلیدی: میگوی پاسفید غربی، *Litopenaeus vanamei* ، ریخت شناسی اسپرم، استان خوزستان.

Copyrights:

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/ by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

۱.مقدمه:

امروزه توسعه روش های موثر در تکثیر مصنوعی نیازمند دانش خوب در زمینه بیولوژی تولید مثل و خصوصیات جنسی گونه های مهم می باشد(Andre *et al*, 2010). در میان جنس های مختلف ده پایان میگو از فراوانی گونه ای نسبتا خوبی برخوردار است. لیتوپنئوس وانامی یکی از گونه های مهم تجاری می باشد که پرورش آن گسترش جهانی دارد(FAO, 2010). بعد از وقوع بیماری لکه سفید در صنعت میگوی کشور، معرفی گونه جدید یکی از روش های نجات صنعت تکثیر و پرورش میگوی کشور تشخیص داده شد (Afsharnasab *et al.*, 2005). میگوی وانامی (سفید غربی) برای اولین بار در سال ۱۳۸۳ توسط موسسه تحقیقات شیلات ایران جهت مطالعات اولیه به منظور امکان سنجی پرورش در شرایط کشور با رعایت اصول قرنطینه و ایمنی زیستی وارد گردید. میگوی سفید غربی دارای ویژگی‌های پرورشی بسیار مناسب است. و از سال ۲۰۰۳ بالاترین تولید را در جهان دارد. میزان بازماندگی این گونه در شرایط کارگاه‌های هچری بالا بوده و بین ۵۰ تا ۶۰ درصد می باشد. همچنین دامنه گسترده-ای از درجات شوری آب را تحمل می کند. این گونه سایز مناسب و رشد بالایی داشته، میزان پروتئین جیره کمتری نیاز داشته و بازار پسندی مناسبی دارد، لذا در نقاط مختلف دنیا به پرورش این گونه روی آورده‌اند (جلالی جعفری،۱۳۸۹، متین فر و همکاران ۱۳۸۶). علیرغم اطلاعات نسبتا بالا در مورد تکثیر و پرورش این گونه در شرایط کشورهای صاحب صنعت پرورش این گونه، با توجه به تاثیر قابل توجه شرایط محیطی بر شاخص های تولید مثلی و پرورشی میگو، بررسی ویژگی‌های مهم تولید مثلی این گونه در شرایط ایران ضروری به نظر می‌رسد. به این منظور تحقیقات و کسب اطلاعات مربوط به کیفیت گنادهای میگوی ماده و نر ارجحیت ویژه دارد (Racotta *et al.*, 2003)). بررسی وضعیت و کیفیت گنادها و اسپرم تولید شده مقدمه‌ای بر تحقیقات تکمیلی به منظور بررسی تاثیر عوامل مختلف محیطی بر کیفیت گامت و نیز استفاده از تکنیک‌های جدید، همانند تکثیر مصنوعی و محافظت ذخیره و نگهدای گامت با سرما (Cryopreservation) می باشد (Tsai and Lin, 2012). تکثیر مناسب میگوهای پنائیده ارتباط مستقیمی با کیفیت مولدین و بویژه گنادها و گامت‌های تولید می باشد، تا لقاح با کیفیت و با نسبت بالا روی دهد و جنین قوی و مقاوم ایجاد گردد(Peixoto *et al.*, 2004). دستگاه تولید مثل در جنس نر میگوی سفید غربی متشکل از یک جفت بیضه می‌باشد که شفاف و چند لبی است و در بالای قلب قرار گرفته است و حاوی یک جفت مجرای دفران است که در انتها به آمپول‌ها یا حباب‌های حاوی اسپرماتوفور یا کیسه‌های اسپرم و نهایتا به پنجمین پای رونده می‌پیوندد. نرها دارای ساختار ویژه‌ای به نام پتاسما می باشند که در انتقال کیسه اسپرم نقش دارد. اسپرم میگوها اغلب غیر متحرک می باشند. میگوهای ماده لیتوپنوس دارای تلیکوم باز می باشد، در حین جفت گیری اسپرماتوفور ها یا کیسه اسپرمی نر را پس از دریافت مدتی در تلیکوم خود نگه می دارد و سپس هنگام تخمریزی آنها را آزاد کرده تا عمل لقاح تخمک و اسپرم همزمان با تخم ریزی ماده صورت گیرد (مجیدی نسب ،۱۳۷۷). هر چند اطلاعات در مورد ویژگی‌ها و کیفیت اسپرم گونه های مختلف میگو در منابع وجود دارد (Ceballos *et al.*, 2004) ولی این منابع در مورد میگوی سفید غربی محدود است (Ceballos *et al.*, 2003; Meunpol *et al.*, 2005) و در کشور نیز مطالعه ای در مورد اسپرم میگو در منابع مشاهده نگردید. البته گزارشاتی از وجود یک همبستگی قوی بین تراکم اسپرم و اسپرماتوکریت و میزان باروری در گونه هایی از آزاد ماهیان، سوف ماهیان و کپور ماهیان وجود دارد (اسلامبولچی، ۱۳۷۷ ,Liley et al., 2002) لذا با توجه به اهمیت صنعت تکثیر و پرورش میگو در ایران و جهان، تحقیق جاری با هدف بررسی ریخت شناسی و کیفی اسپرم و اسپرماتوفور میگوی سفید غربی با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست، میکروسکوپ الکترونی و روش Atomic Force Microscopy انجام گرفت، همچنین میزان همبستگی شاخص های زیست سنجی و شاخص-های کیفی اسپرم نیز بررسی گردید.

۲. مواد و روش ها

تعداد ۲۰ عدد میگوی مولد نر مولد رسیده وانامی (متوسط وزن۴,۳±۳۵,۳۷ گرم) از یکی از کارگاه‌های تکثیر میگوی منطقه چوئبده آبادان به صورت زنده و با استفاده از مخزن ۲۰۰ لیتری و کپسول اکسیژن و رعایت اصول انتقال میگو به دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل گردید. بعد از آداپتاسیون با شرایط آزمایشگاه به مدت دو روز و تغذیه با خوراک مخصوص مولد میگو، ویژگی‌های زیست سنجی میگوها شامل وزن و طول میگو، وزن بیضه، وزن اسپرماتوفور، ملانیزه بودن و یا عدم ملانیزاسیون اسپرماتوفور اندازه گیری و ثبت گردید.

اسپرماتوفور میگوهای نر بر اساس روش(Alfaro, 1993a) استحصال گردید، به‌طور خلاصه، بعد از بررسی وضعیت رسیدگی جنسی مولید میگوی نر که با مشاهده اسپرماتوفور سفید رنگ زیر نور در محل بین پای پنجم و ششم شنا قابل مشاهده است، میگو ها به آرامی با یک پارچه نرم صید شده و با فشار مختصر از بیرون به داخل در محل پنجمین پای شنا، اسپرماتوفور خارج شده و با یک پنس استریل آنرا برداشته و به آرامی وارد میکروتیوب حاوی آب استریل دریا گردید. بعد از خارج نمودن اسپرماتوفور وزن هر اسپرماتوفور با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه گیری شد. میزان ملانیزاسیون اسپرماتوفور نیز که بصورت سیاه شدگی راس اسپرماتوفور نمود دارد، مشخص گردید.

شمارش اسپرم‌ها به روش توصیه شده توسط(Leung-Trujillo and Lawrence, 1987) انجام شد، اسپرماتوفور خارج شده از بدن میگو بعد از وزن کشی در بافر تریس آماده شده با آب دریای استریل به نسبت ۱ به ۱۰ مخلوط گردید و تعداد اسپرم با استفاده از لام هموسیتومتر شمارش گردید.

برای بررسی زنده مانی اسپرم‌هااز رنگ ائوزین نگروزین و روش‌توصیه‌شده‌توسط (jeyalectumie and subramoniam,1989) استفاده گردید. بررسی زنده مانی اسپرم‌ها ابتدا اسپرم‌ها با رنگ ائوزین – نگروزین به مدت ۱۵ دقیقه رنگامیزی گردیدند و اسپرم‌های زنده که بصورت فعال از ورود رنگ به داخل سلول جلوگیری کرده و رنگ نگرفته بودند زنده و اسپرم‌های رنگ آبی تیره را به خود گرفته بودند مرده تلقی شدند. میزان زنده مانی با شمارش ۱۰۰ سلول در هر نمونه با بزرگنمایی ۴۰۰ میکروسکوپ فاز کنتراست مشخص گردید(Braga *et al.*, 2010).

بررسی موفومتریک اسپرم‌ها با استفاده از نرم افزار Image j انجام گرفت. به این منظور اسپرم‌ها به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق شده (بطوریکه اسپرم بدون همپوشانی و قابل شمارش باشند) با رنگ گیمسای۱۰٪ به مدت ۴۰ دقیقه رنگامیزی شده و وضعیت طبیعی یا غیر طبیعی بودن و قطر و مساحت اسپرم اندازه گیری شد.برای اطمینان بیشتر و دریافت اطلاعات دقیق‌تر اقدام به مورفومتری اسپرم‌ها به دو روش میکروسکوپ الکترونی و AFM نیز گردید.

به منظور آماده سازی نمونه اسپرم جهت عکس برداری با میکروسکوپ الکترونی ، اسپرماتوفور را از بیضه خارج نموده سپس در محلول پایدارکننده گلوتر آلدهید ۱ درصد به میزان ۱۲ سی سی و مدت زمان ۳ ساعت نگهداری گردید. بعد از آن محلول را سانتریفیوژ(۱۲۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه) نموده و سپس محلول روئی را دور ریخته و با کمک بافر فسفات طی سه مرحله شستشو با سانتریفوژ در ۱۲۰۰ دور و به مدت دو دقیقه انجام شد. در مرحله بعد نمونه اسپرم برای تثبیت سایر محتویات، بویژه ترکیبات لیپیدی،در ۱۰ میلی لیتر محلول اسمیوم تتراکساید ۱ درصد قرار داده شد و به مدت زمان یک ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه گردید، سپس اسپرم مجددا شستشو گردیده (دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه) و نهایتا با آب دوبار تقطیر سه مرحله شستشو گردید.. سپس آبگیری توسط استن انجام شد، بدین منظور غلظت های افزایشی استن ۳۰٪ ، ۵۰٪، ۷۵٪ ، ۹۵٪ ، ۱۰۰٪ تهیه شده و نمونه به ترتیب به مدت ۲۰ دقیقه در هر یک از غلظت‌ها نگهداری گردید، در پایان غلظت مناسبی از نمونه پایانی روی کاغذ آلومینیومی مربعی به ابعاد یک سانتیمتر قرار داده شد، نمونه با Critical point drier آماده سازی شده و پوشش طلا

روی نمونه ها داده شد و نمونه‌ها به روش SEM مورد بررسی قرار گرفتند.

به منظور بررسی میگو با روش Atomic Force Microscopy، از روش توصیه شده توسط Narahari et al., 200 استفاده شد. در این روش پس از خارج نمودن دو اسپرماتوفور(شکل ۱) هر یک از اسپرماتوفورها درون پلیت شیشه قرار داده شد و بعد از قطعه قطعه نمودن اسپرماتوفور در بافر فسفات و تهیه رقت ۱:۵ از نمونه در بافر، ۵۰ میکرولیتر از نمونه روی لام مخصوص دستگاه AFM قرار داده شد، نمونه ها به مدت یک ساعت در شرایط آزمایشگاه انکوبه شده و بعد از اینکه نمونه رطوبتش را از دست داد و قبل از اینکه نمونه بیش از حد خشک شود و شکل اسپرمها چروکیده و دفرمه شود، اقدام به تهیه عکس AFM از نمونه گردید.

به منظور تجزیه و تحلیل آماری، مقادیر اندازه گیری شده در ۲۰ میگوی مورد بررسی بصورت میانگین، انحراف معیار، میزان حداکثر و میزان حداقل با ضریب اطمینان ۹۵٪ بیان گردید و برای بررسی همبستگی بین شاخص ها از شاخص ضریب همبستگی R و Spearman Correlation Coeficients در نرم افزار SAS استفاده گردید.

شکل۱. نحوه‌ی خارج نمودن اسپرماتوفور میگوی نر سفید غربی رسیده از منطقه بین پاهای چهار و پنج حرکتی (اسپرماتوفور با پیکان سفید مشخص شده است)

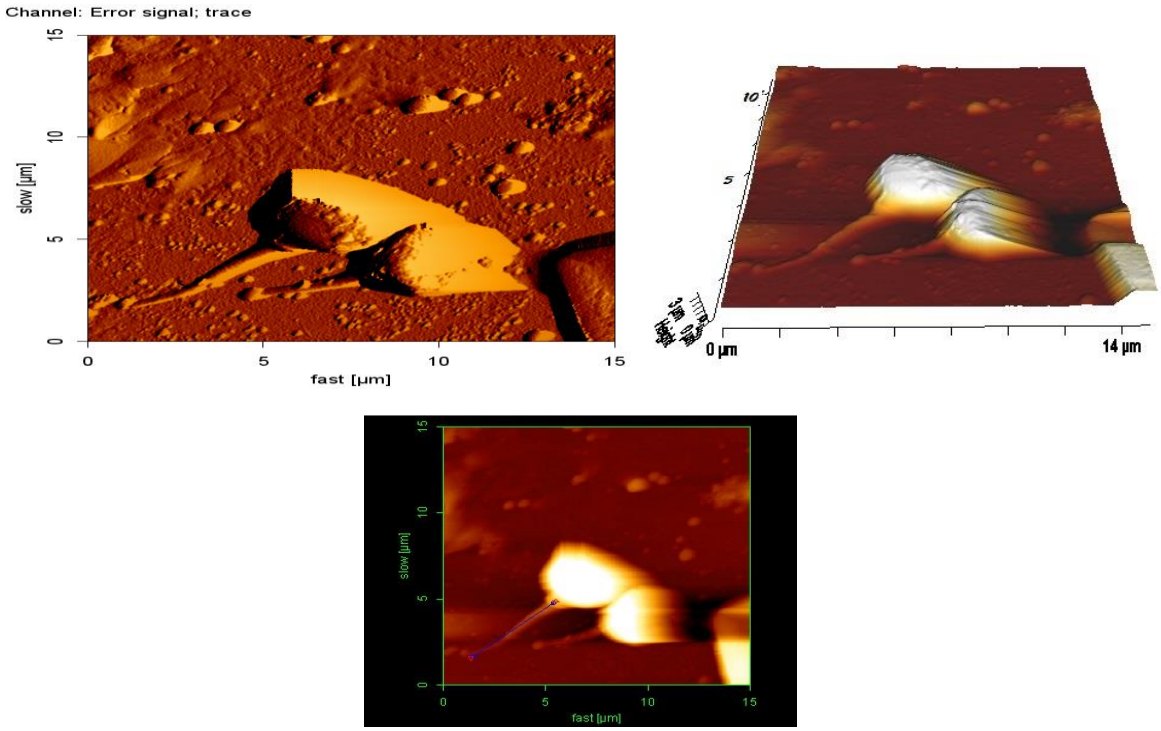
۳.نتایج

در بررسی همبستگی بین شاخص های مورد بررسی، میزان زنده مانی اسپرم بیشترین همبستگی را با تعداد اسپرم (R2=۰/۸۳۱)، وزن بیضه (R2=۰/۸۲۴) و وزن بدن (R2=۰/۷۱۶) داشت که همه با ضریب خطای کوچکتر از ۰/۰۰۱ معنی دار بودند. از طرفی بین درصد اسپرم‌های غیر طبیعی و شاخص های مورد بررسی نتایج مربوط به شاخص های مورد بررسی در جدول ۱ آورده شده است. همه میگوها بالغ و رسیده بودند، همانطور که در جدول ۱ مشاهده می گردد میگوها وزن متوسط حدود ۳۷/۴ گرم و طول ۱۷/۵ سانتیمتر داشته، وزن اسپرماتوفور و وزن بیضه به ترتیب ۱۸۰ و ۸۰ میلی گرم گزارش گردید. تعداد اسپرم و ضریب ملانیزاسیون اسپرماتوفور به ترتیب ۲/۱۳ میلیون و ۱۵درصد بود.

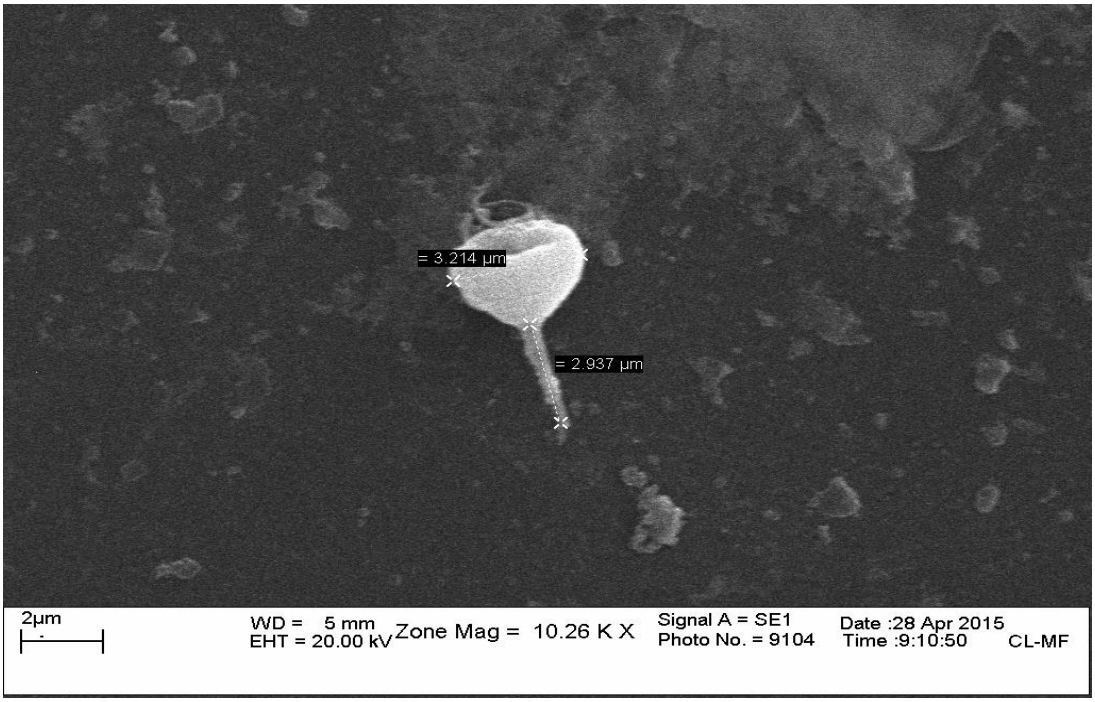
همبستگی معنی داری مشاهده نگردید هرچند بیشتر شاخص ها، مثل وزن بیضه، تعداد اسپرم، میزان زنده مانی اسپرم‌ها همبستگی منفی با این شاخص داشتند. میزان زنده مانی و تعداد اسپرم و وزن اسپرماتوفور نیز همستگی بالایی‌باقطرومساحت‌اسپرم‌نشان‌دادند.

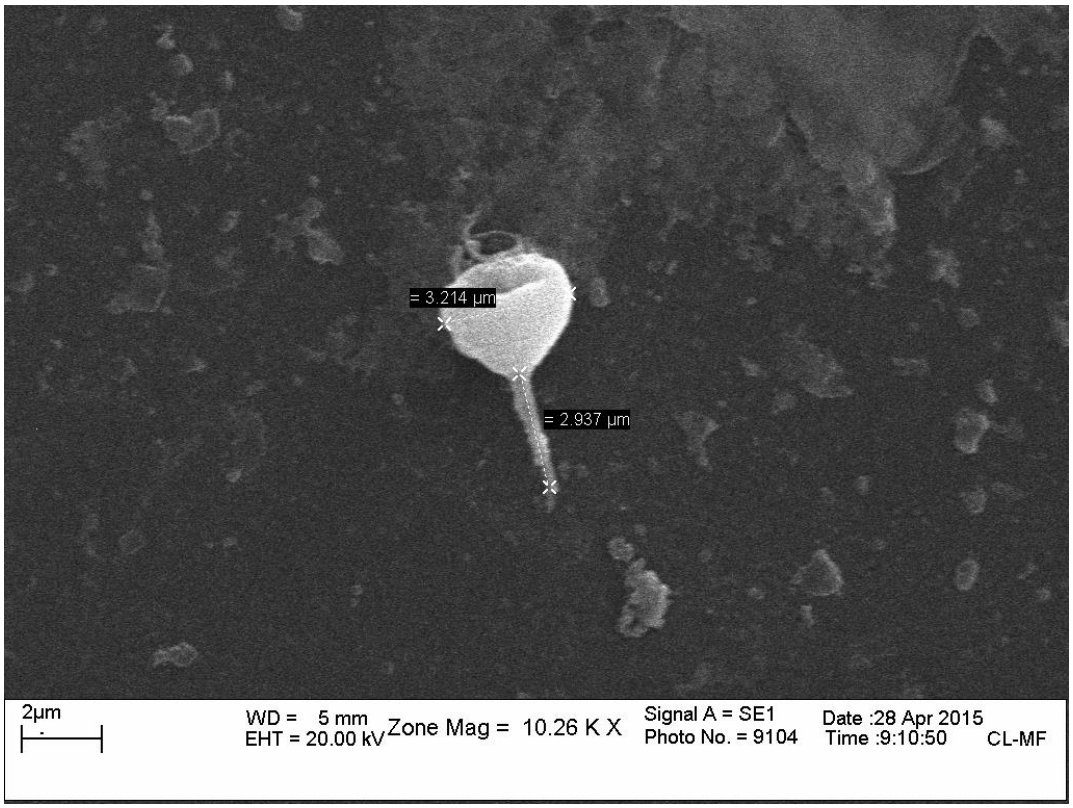
جدول ۱.شاخص‌های زیست سنجی و کیفیت اسپرم در میگوی سفید غربی نر (تعداد نمونه ۲۰ قطعه و حد بالا و حد پایین با احتساب ضریب اطمینان ۹۵٪ در نظر گرفته شده اند)

شاخص	میانگین	انحراف معیار	حد بالا	حد پایین
وزن (گرم)	۳۵/۳۷	۲/۶۴	۳۹/۸	۳۰/۳
طول (سانتیمتر)	۱۷/۵۲	۰/۵۷	۱۸/۵	۱۶/۵
وزن بیضه (گرم)	۰/۱۸	۰/۰۱	۰/۱۹۷	۰/۱۵۸
وزن اسپرماتوفور (گرم)	۰/۰۸	۰/۰۱	۰/۰۸۹	۰/۰۶۱
وزن بدن/وزن اسپرماتوفور	۲/۱۳	۰/۱۶	۲/۴۰	۱/۹۳
ملانیزاسیون (٪)	۱۵	۰	۱	۰
تعداد اسپرم (میلیون)	۴/۱۹	۰/۳۸	۵/۱	۳/۷
قطر اسپرم (میکرومتر)	۳/۹۴	۱/۱۱	۶/۱۳	۱/۹۹
مساحت اسپرم (میکرومترمربع)	۱۴/۲۰	۱/۷۹	۲۱/۴۱	۴/۳۹
اسپرم غیر طبیعی (٪)	۱۵/۵۶	۱/۵۰	۲۰	۱۳
زنده (٪)	۶۹/۶۹	۲/۳۹	۷۶	۶۶



شکل ۲. تصویر AFM از اسپرم میگوی وانامی، بالا: تصویر دو بعدی از دو اسپرم (ناهمواری‌های اطراف اسپرم، نمک موجود در بافر است که رسوب کرده است)، پایین سمت راست





شکل ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM از اسپرم میگوی وانامی، بزرگنمایی ۱۰۲۰۰ برابر، طول دم و قطر اسپرم در تصاویر بالا و تصویر پایین مشخص است

جدول ۲- میزان همبستگی (R^2) بین شاخص های بیولوژیک میگو وانامی و شاخص‌های کیفی اسپرم

Variable	وزن بدن	وزن بیضه	تعداد اسپرم	وزن اسپرماتوفور	زنده مانی	اسپرم غیر طبیعی	قطر اسپرم	مساحت سر اسپرم
وزن بدن	۱	*۰/۹۵۸	*۰/۷۶۶	۰/۲۹۲	*۰/۷۱۶	۰/۱۵۷	*۰/۸۳۲	*۰/۹۱۱
CF ضریب خطا		۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۲۷۲۵	۰/۰۰۱۸	۰/۵۵۹۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱
وزن بیضه		۱	*۰/۸۳۷	۰/۲۸۲	*./۸۲۴	-۰/۳۶۵	*۰/۸۹۱	*۰/۹۳۲
CF ضریب خطا			۰/۰۰۰۱	۰/۲۸۹۸	۰۰۰۱./	۰/۲۳۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱
تعداد اسپرم			۱	۰/۳۴۲	*۰/۸۳۱	_۰/۲۰۴	*۰/۷۰۵	*۰/۶۹۷
CF ضریب خطا				۰/۱۹۴۵	۰/۰۰۰۱	۰/۴۴۷۰	۰/۰۰۲۳	۰/۰۰۲۷
وزن اسپرماتوفور				۱	۰/۲۹۳	-۰/۲۰۵	*۰/۷۳۹	*۰/۷۲۸
CF ضریب خطا					۰/۲۷۰۰	۰/۴۴۷	۰/۰۰۱۱	۰/۰۰۰۱
زنده مانی					۱	-۰/۱۳۱	*۰/۷۹۸	*۰/۶۷۸
CF ضریب خطا						۰/۶۳۰۱	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۲
غیر طبیعی						۱	۰/۰۵۶-	۰/۰۹۷-
CF ضریب خطا							۰/۹۸۴	۰/۷۳۴
قطر اسپرم							۱	*۰/۸۹۶
CF ضریب خطا								۰/۰۰۰۱
مساحت سر اسپرم								۱

علامت * نشان دهنده معنی دار بودن همبستگی دو شاخص مورد مقایسه در سطح اطمینان ۹۵٪ می باشد.

۴. بحث و نتجه گیری

از آنجا که میگوی لیتوپنئوس وانامی چند سالی است که در کشور پرورش داده می شود، متاسفانه در مورد شاخص های تولید مثلی این گونه مطالعه‌ای صورت نگرفته است، هر چند تلاش هایی در جهت مقایسه شرایط تولید مثلی این گونه در کشور با سایر کشورها صورت گرفته است. بررسی وضعیت و کیفیت گنادها و اسپرم تولید شده مقدمه‌ای بر تحقیقات تکمیلی به منظور بررسی تاثیر عوامل مختلف محیطی بر کیفیت گامت و نیز استفاده از تکنیک‌های جدید، همانند تکثیر مصنوعی و محافظت ذخیره و نگهدای گامت با سرما (Cryopreservation) می باشد (Tsai and Lin , 2012). لذا در این تحقیق شاخص های مربوط به ویژگیهای تولید مثلی جنس نر این میگو در شرایط استان خوزستان بررسی گردید.

نتایج این تحقیق نشان داد که بسیاری از شاخص های تولید مثلی جنس نر میگوی وانامی پرورشی کشور مشابه ویژگی‌های این گونه در سایر نقاط دنیاست، هر چند تفاوت‌های کمی دربرخی شاخص‌ها مشاهده شد. ویژگی-های تولید مثلی جنس نر میگوی وانامی اولین بار توسط(Dougherty et al., 1989) گزارش گردید. نتایج تحقیق جاری نشان داد که وزن اسپرماتوفور و تعداد اسپرم هر اسپرماتوفور در میگوهای حدود ۱۸ ماهه مورد بررسی به ترتیب ۸۰ میلی گرم و ۴/۲۱ میلیون بود. مقایسه نتایج این تحقیق با تحقیقات مشابه روی این گونه نشان داد که کیفیت اسپرماتوفور میگوهای نر مورد بررسی مشابه با این گونه در سایر کشورهاست. استانداردهای متعددی برای کیفیت اسپرماتوفور میگو بیان شده است (Peixoto *et al.*, 2003) برای مثال برای میگوی نر با وزن ۲۰ تا ۲۷ گرم اسپرماتوفور ۷ تا۱۸ میلی گرم و تعداد اسپرم ۱/۲ تا ۳/۷ میلیون در هر اسپرماتوفور گزارش شده است. همچنین در بررسی توسط(Ceballos et al., 2004) روی میگو وانامی انجام شد، وزن اسپرماتوفور ۱۴ تا ۳۶ میلی گرم، تعداد اسپرم را ۱/۲-۳/۷ میلیون اسپرم گزارش کردند. همچنین در بررسی دیگری که توسط(Amrit et al., 2006) روی میگوی *penaeus monodon* انجام شد میانگین وزن اسپرماتوفور و تعداد اسپرم را به ترتیب ۳/۲۹ و ۴۸ میلی گرم و تعداد ۳/۸ میلیون گزارش نمودند، که مشابهت بالای نتایج تحقیق جاری با این گزارشات را نشان می دهد.

فاکتور مهم دیگری که کیفیت اسپرماتوفور را تعیین می کند ملانیزاسیون و یا عدم ملانیزاسیون می باشد. ملانیزاسیون اسپرماتوفور یک شاخص منفی کیفی تولید مثلی میگو می باشد. میزان ملانیزاسیون اسپرماتوفور بستگی به عوامل مختلفی دارد، پیری، استرس‌های محیطی و تغذیه ای، بیماریهای عفونی باعث افزایش

میزان ملانیزاسیون اسپرماتوفور می گردد (Andre *et al*, 2010). (Alfaro et al.,1993) گزارش کردند که کیفیت اسپرماتور تحت تاثیر دو عامل قرار گیرد: یکی عوامل پاتوژن مانند عوامل باکتریایی و ویروسی که همراه با ایجاد استرس سبب کاهش کیفیت اسپرماتوفور می‌گردد. عامل دوم بالا بودن درجه حرارت آب که تاثیر منفی روی اسپرماتوفور داشته و ملانیزاسیون انتهای اسپرماتوفور را باعث می گردد (Peixoto *et al* , 2004, . Perez-Velazquez *et al* 2001, Sanchez *et al* 2001.). نتایج میانگین درصد ملانیزاسیون در بررسی حاضر ۱۵٪ بود، که با توجه به سن ۱۲ تا ۱۸ ماه مولدین مناسب به نظر می رسد.(Doughertyv et al.,1990) عنوان کردند که فرآیند ملانیزاسیون اسپرماتوفور و کاهش کیفیت اسپرماتوفوور در اکثر موارد با تغییرات مرتبط با سن میگوها متناسب است به عبارت دیگر میگوهای مسن تر علاوه بر کیفیت پایین تر اسپرماتوفور، نسبت به کاهش کیفیت اسپرم تحت تاثیر دمای محیط نیز حساسیت بیشتری دارند. همچنین در بررسی که برروی کیفیت اسپرم در ارتباط با وزن و سن بر میگوی وانامی انجام گرفت، علاوه بر افزایش درصد ملانیزاسیون اسپرماتوفور، بیش از ۲٪ میگوهای بالای یکسال فاقد اسپرماتوفور بودند که با افزایش سن این درصد روند افزایشی داشت(Ceballos *et al*., 2004).

در تحقیق جاری تعداد اسپرم های زنده و غیر طبیعی به ترتیب برابر۶۹/۷٪ و ۱۵/۶٪ گزارش شد که این نتایج با بررسی که(Ceballos et al., 2003) روی میگو وانامی انجام دادند مشابهت دارد، آنها در تحقیق خود نسبت اسپرم های زنده را ۷۳/۷٪ گزارش نمودند. همچنین در تحقیقی دیگر وزن قابل قبول اسپرماتوفور و تعداد اسپرم هر اسپرماتوفور درمیگوی *F.paulensis* با وزن ۲۰ تا ۲۷ گرمی برای تکثیر را به ترتیب ۷ تا ۱۸ میلی گرم و ۳/۷ – ۱/۲ میلیون اسپرم برای هر اسپرماتوفور گزارش شد(Peixoto *et al*., 2003). در تحققق مشابه بر روی میگوی *Penaeus setiferus*، میگوهای نر با وزن بالای ۳۶ گرم بیشترین میزان اسپرم طبیعی را داشتند (Rosas *et al*., 1993). هر چند در تحقیق جاری همبستگی معنی داری بین تعداد اسپرم، وزن میگو و اسپرماتوفور با درصد اسپرم‌های غیر طبیعی مشاهده نشد ولی Alfaro et al.,1993) مشاهده نمودند که ارتباط منفی بین درصد اسپرم های غیر طبیعی و تعداد اسپرم میگوی *Penaues stylirostris* وجود دارد. در میگو سه مرحله رسیدگی جنسی وجود دارد (Alfaro,1993). که به ویژه برای جنس *L.vanamei* بهترین کیفیت اسپرم در وزن بالای ۳۸ گرم می باشد. افزایش تعداد اسپرم و کاهش اسپرم های غیر طبیعی در ارتباط با وزن میگو و خصوصیات فرآیند دگردیسی در میگوهای نر پنائیده گزارش شده است. (Pratoomchat, et al., 1993).

در این تحقیق برای اولین بار از تکنیک AFM برای بررسی ریخت شناسی اسپرم میگو استفاده شد، از مزیت های این روش امکان تصویر برداری طبیعی از بافت‌های جانوری بدون استفاده از پایدارکننده که تغییرات ساختمانی در حالت طبیعی نمونه ایجاد می کنند، و دقت در حد نانو و تصاویر سه بعدی از جهات مختلف است. در تصاویر AFM اسپرم میگوی سفید غربی یک سر قلبی شکل و یک دم موشی شکل دیده شد که در بررسی میکروسکوپی(حتی با میکروسکوپ دارک فیلد و فازکنتراست) نیز قابل مشاهده نمی باشد و شاید به دلیل عدم مشاهده دم اسپرم میگو عدم تحرک به این اسپرم نسبت داده شده است. یافته های سه بعدی اسپرم نشان داد که سر اسپرم در قسمت میانی برجسته‌تر نسبت به اطراف آن بوده و سطح مقطع دم نیز در تمام طول تقریبا گرد است. از آنجا که تحقیقی با استفاده از این روش در اسپرم میگو و حتی ماهی وجود نداشت، روش‌های مختلف بررسی اسپرم انسانی روی نمونه ها بررسی شد و بهترین روش انتخاب گردید، مهم‌ترین مشکل حساسیت اسپرم به دلیل عدم استفاده از پایدار کننده و لزوم حفظ فشار اسمزی اسپرم در مراحل تهیه تصویر و همچنین مزاحمت ذرات نمک در تصویر برداری می باشد. در تحقیقی بر روی اسپرم انسان با استفاده از روش AFM، علاوه بر بررسی ساختار اسپرم سالم، تغییر در گردن اسپرم بدنبال برخی عوامل سمی گزارش شده است (Narahari, 2001). در این تحقیق اشاره شده است که این ناهنجاری حتی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی قابل تشخیص نبوده است. مطالعات در ارتباط با بررسی اسپرم میگو با استفاده از میکروسکوپ الکترونی بسیار محدود است (Klaus *et al*., 2009). در برخی مطالعات از این روش علاوه بر

ریخت شناسی دقیق اسپرم، برای تشخیص زیر گونه های یک گونه نیز استفاده شده است (Niksirat *et al.*, 2013). در کشور نیز مطالعه ای روی بررسی فرا ساختار اسپرم کپور معمولی و قزل آلا انجام شده است (ابراهیمی، ۱۳۸۳)، هر چند روش تهیه نمونه و کیفیت تصویر قابل قبول نبوده و تصویر با بزرگنمایی تا ۵۰۰۰ برابر تهیه شده است. در تحقیق حاضر علاوه بر استفاده از روش نسبتا جدید در تثبیت نمونه، تصاویر با کیفیت بالا از اسپرم میگوی وانامی تهیه گردید. در تحقیق جاری بررسی‌های کمی و ریخت شناسی اسپرم میگو به سه روش میکروسکوپ الکترونی، میکروسکوپ فاز کنتراست و روش AFM تطابق کاملی با هم داشتند،

نتایج این تحقیق نشان داد که همبستگی معنی داری بین وزن بدن و وزن بیضه میگوها وجود دارد (ضریب همبستگی R=0.958) از طرفی وزن بدن با تعداد اسپرم (R=0.766)، درصد بقا (R=0.716) و مساحت اسپرم (R=0.91) و قطر اسپرم (R=0.832) نیز همبستگی معنی داری نشان داد (سطح معنی داری ضرایب همبستگی در جدول ۱ آورده شده است).. همبستگی بین شاخص های بیومتریک میگو و خصوصیات تولید مثلی میگو در تحقیقات مختلف بررسی شده است. Ceballos (et al.,2003) ارتباط مستقیمی بین وزن میگو و وزن اسپرماتوفور، کیفیت اسپرم تا ۱۸ ماهگی گزارش نمودند، البته آنها ارتباط معکوسی(R=-0.43) بین میگوهای نر فاقد اسپرماتوفور و سن میگو تا ۱۸ ماهگی و همچنین اسپرم‌های غیر طبیعی و وزن میگو (R=-0.73) گزارش کردند، به علاوه حداکثر اسپرم‌های طبیعی را در میگوی یکساله و ۳۸ گرمی (حدود ۷۴درصد) گزارش نمودند که با وزن میگو و وزن اسپرماتوفور همبستگی معنی داری داشت. نتایج مشابه در میگوی مونودون توسط (Pratoomchat et al.,1993) گزارش گردید. Rosaset (al., 1993) نیز در میگوی وانامی ضمن گزارش همبستگی مشابه تحقیق جاری بین وزن، سن و کیفیت اسپرم، بهترین وزن و سن میگوی نر از نظر کیفیت اسپرم تولیدی را ۱۲ ماهگی و وزن ۴۲ گرمی گزارش نمودند.. هر چند در تحقیق حاضر همبستگی منفی بین اسپرم‌های غیر طبیعی و تعداد کل اسپرم(0.312) و وزن اسپرماتوفور (0.23) معنی دار نبود، ولی (Alfaro,1993)چنین ارتباطی را در میگوی *P.stylirostris* بصورت معنی دار گزارش کرد، او چنین نتیجه گرفت که میگوهایی که اسپرم بیشتری از هر اسپرماتوفور تولید می کنند، بدشکلی کمتری در اسپرم‌ها مشاهده می گردد. چنین ارتباطی می تواند به دلیل مراحل تکاملی اسپرم در اسپرماتوفور همزمان با مراحل رشدی میگو باشد. این مجاری در بلوغ نهایی اسپرم و شکل گیری دم اسپرم نقش دارند (Alfora, 1993). عدم مشاهده همبستگی معنی دار بین بدشکلی های اسپرم و شاخص های بیومتریک میگو در تحقیق جاری می تواند به دلیل استفاده از میگوهای بالغ رسیده (۱۸ ماهه) که همه شرایط تولید مثلی مشابهی داشته اند و بلوغ کامل همه گنادها باشد. بد شکلی‌های معمول در اسپرم میگوی وانامی شامل فقدان دم، دم خمیده و بدشکلی سر اسپرم می باشد(Alfora, 1993)، که بد شکلی مربوط به دم اسپرم بیشتر در زیر ۱۲ ماه مشاهده می گردد. برعکس موارد فوق ملانیزه شدن اسپرماتوفور معمولا در سنین بالاتر بیشتر حادث می شود. که علاوه بر سن، عوامل محیطی مختلف باعث عدم خروج اسپرماتوفور و ملانیزه شدن آن می شوند. سیستم دفاعی پروفنل اکسیداز میگو تحت تاثیر استرس های محیطی و عوامل بیماریزا و افزایش سن، اسپرماتوفور خارج نشده را ملانیزه می نماید که مراحل ملانیزه شدن اسپرماتوفور تاثیر منفی بر کیفیت اسپرم تولیدی دارد. با توجه به پایین بودن کیفیت اسپرم میگوی وانامی در سن زیر یکسال و بالارفتن درصد ملانیزاسیون در سن بالای ۱۸ ماه، نرهای با سن بین ۱۲ تا ۱۸ ماه اسپرم با کیفیت مناسبتری تولید می نمایند. به عنوان نتیجه کلی می توان عنوان کرد که ویژگی‌های تولید مثلی میگوی نر وانامی در شرایط استان خوزستان مشابهت زیادی به این شاخص ها در سایر نقاطه دنیا دارد، هر چند تفاوت هایی بین این شاخص ها و ارتباط این شاخص ها با شاخص های بیومتریک میگوی نر دیده می شود.که بررسی اثر آنها روی کیفیت باروری میگو احتیاج به تحقیقات بیشتر دارد.

۵. تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز و از محل پژوهانه نگارندگان انجام گرفت.

Refrences:

اسلامبولچی، ش. (۱۳۷۸) ؛ تخمین تراکم اسپرم ماهی کپور معمولی، آمور وازونبرون با استفاده از روش اسپکتروفتومتری. پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دا نشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

جلالی جعفری، ب.، برزگر دولت آبادی، م. (۱۳۸۹). مدیریت بهداشتی پرورش میگو. چاپ دوم. ۲۵۶ صفحه. صص ۱۶-۱۷.

مجیدی نسب، الف. (۱۳۷۷). بیماری های میگو های پرورشی. انتشارات نوربخش، جلد اول.

متین فر، ع.، رمضانی فرد، الف. و حقوقی پور، م. (۱۳۸۶). بررسی اثرات درجه حرارت و شوری های مختلف بر رشد و بازماندگی میگوی جوان پاسفید ، مجله پژوهش و سازندگی ، امور دام و آبزیان ، شماره ۷۷، صص ۱۰۴-۹۶.

Afsharnasab, M., Dashtiannasab, A., Yeganeh,V., 2005. Assessing pathogenesis of the White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Whiteleged shrimp. IRAN J FISH SCI, 16, 1, 1-8.

Alfaro J, X. 1993a, Development and deterioration of spermatophores in pond-reared *Penaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society, 1993, 24, 522-529.

Alfaro J, Reproductive quality evaluation of male *Penaeus stylirostris* from a grow-out pond. J. World Aquac. Soc., 1993b, 24, 6-11.

Amrit, N., Bart, Sudarhma C., Dhirendra P. T, 2006. Spermatophor cryopreservation and artificial insemination of black tiger shrimp, *penaus monodon*. Aquaculture Res, 37, 523-528 .

Andre, L. B., Cintia L.N, juscilaine G.M., Elton P.C. and Wasielesky j. r, 2010. Spermatophore quality of the pink shrimp *Fartepenaeus paulensis* (Decapoda Dendrobrachiata) broodstock fed with different maturation diets. Aquaculture 307, 34-48.

Ceballos, B. P., Rosas. C. and Racotta. I. S., 2004. Sperm quality in relation eoage and weight of White shrimp Litopenaeus vannamei, Aquaculture, 228, 141-151.

Ceballos-Vázquez, B.P., Aparicio-Simón, B., Palacios, E., Racotta, I.S., 2003. Sperm quality performance of captive *Farfantepenaeus paulensis* broodstock. Aquaculture 238, 173–182.

over consecutive spermatophore regeneration in the Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei. J. World Aquac. Soc. 35 (2), 178–188.

Dougherty, W.J., Dougherty, M.M., 1989. Electron microscopical and histochemical observation on melanized sperm and spermatophores of pond-cultured shrimp, Peneaeous vannamei, J Inverteb Pathol, 54, 331-343

FAO (Food and Agriculture Organization), 2010. The state of world fisheries and aquaculture. Rome: FAO; Annual report.

Jeyalectumie C, Subramoniam T., 1989. Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the crab Scylla serrata. Biol Bull.; 177: 247-253.

Klaus, S., Schubart, C.D., Brandis, D., 2009. Ultrastructure of spermatozoa and spermatophores of old world freshwater crabs (Brachyura: Potamidea: Gecarcinucidae, Potamidae, and Potamonautidae). J. Morpholo, 270, 175–193.

Leung-Trujillo J.R., A. L. Lawrcncc, 1987. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeous setiferous* under laboratory conditions. *Aquaculture*, *35*, 363-370.

Liley, N.R., Tamkee,P., Tsai, R. and Hoysak, D.J., 2002. Fertilization and dynamics in rainbow trout: Effects of male age, social experience and spermconcentration and motility on in vitro fertilization. : CAN J FISH AQUAT SC, Volume 59, 1, 144-152(9).

Meunpol, O., Meejing, P., Piyatiratitivorakul, S., 2005. Maturation diet based on fatty acid content for male Penaeus monodon (Fabricius) broodstock. Aquac. Res. 36, 1216–1225.

Narahari, J., 2001. Determination of the ultrastructural pathology of human sperm by Atomic Force Microscopy, Fertility Sterility, 75, 5, 1-12.

Niksirat, H., Kouba. A., Psenicka. M., Kuklina, L., 2013. Ultrastructure of spermatozoa from three genera of crayfish Orconectes, Procambarus and Astacus (Decapoda: Astacoidea): New findings and comparisons, Zoologischer Anzeiger 252 (2013) 226–233.

Peixoto, S., Cavalli, R.O., Wasielesky, W., D'Incao, F., Krummenauer, D., Milach, A.M., 2004. Effects on age and size on reproductive

Peixoto, S., Cavalli, R.O., Wasielesky, W., D'Incao, F., Krummenauer, D., Milach, A.M., 2004. Effects of age and size on reproductive performance of captive Farfantepenaeus paulensis broodstock. Aquaculture 238, 173–182.

Peixoto, S., Wasielesky, W.J., Louzada, L.J., 2003. Comparative analysis of pink shrimp, Farfantepenaeus paulensis, and Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei, culture in extreme Southern Brazil. J. Appl. Aquac. 14, 101–112.

Perez-Velazquez, M., Bray, W.A., Lawrence, A.L., Gatlin, D.M., González-Félix, M.L., 2001. Effect of temperature on sperm quality of captive Litopenaeus vannamei broodstock. Aquaculture 198, 209–218

Pratoomchat, B., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P., Fast, A.W., 1993. Sperm quality of pond-reared and wild caught *Penaeus monodon* in Thailand. J. World Aquac. Soc. 24, 530– 540.

Racotta, I.S., Palacios, E., Ibarra, A.M., 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. Aquaculture 227, 107–130.

Rosas, C., Sanchez, A., Chimal, M.A.E., Saldana, G., Ramos, L., Sota, L.A., 1993. The effect of electrical stimulation on spermatophore regeneration in white shrimp Penaeus setiferus. Aquat. Living Resour. 6, 139–144.

Sanchez, A., Pascual, C., Sanchez, A., Vargas-Albores., F. and Moullac, G.L. 2001. Hemolymph metabolic variable and immune response in Litopenaeus setiferus adult males: the effect of acclimation .Aquaculture 198, 13-28.

Tsai, S. and Lin, C., 2012. Advantages and Applications of Cryopreservation in Fisheries Science. Can.J. Fish. Aquat. Sci. 59:144-15.

Journal of Marine Science and Technology

Winter 2021, Vol. 20, No. 4. P:107-118.

Available Online: http://jmst.kmsu.ac.ir

Original Article

Study of Some Quality and Structural Charachteristics of *Litopenaeus Vanamei*'s Sperm in Khouzestan Province, Iran

Mojtaba Alishahi*, Mohammad MehdiI Haghparast Radmard, Maryam Shokoohmand, Farid Barati

Department of Clinical sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

* Corresponding Author E-mail: alishahim@scu.ac.ir

Received: 30 September 2015 **Accepted:** 30 August 2016

DOI: 10.22113/JMST.2016.32081

Abstract

Regarding expansion of Litopenaeus vanamei culture in Iran, and the necessity to work on its reproduction system, conducting a research on its biological reproduction and sexual properties is of high value and sexual properties. Then in this study morphological properties of *L. vanamei's* sperm were evaluated using phase contrast microscope, Atomic Force Microscopy technique and Electronic microscope. Wight of testis and spermotophore as well as density and survival rate of sperms were measured in L. vanamei. For this purpose, 20 mature male *L. vanamei* (35.37 ±4.3) were transferred from a local shrimp hatchery to laboratory. Biometrical indices as well as reproductive properties of shrimp (density, diameter and size of sperms, spermatophore weight and melanisation) were measured. Correlation coefficient between all indices were measured too. Results showed that testis and spermatophore weight were 0.18±o.01g and 0.08±0.01g respectively. Sperm count, survival rate and diameter of sperms were 41.19±3.83 per µl, %69.69±%2.39 and 39.36±10.8 respectively. The highest correlation coefficient was seen between shrimp weight and testis weight (R=0.958), sperm diameter (R=0.91) and sperm survival (R=0.716) respectively, although there was no significant correlation between abnormal sperm or melanized spermatophores and other biometrical indices.

Key words: *Litopenaeus vanamei*, sperm morphology, Khouzestan province

Copyrights:

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons. org/licenses/ by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.